

Vergleichende Untersuchungen über die
Oxydation von Monohydroxy- und
o-Dihydroxybenzolen durch Phenoloxydase

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

Überreicht von

Gerhard Mues

aus Berlin

1967
—

1. Referent: Prof. Dr. K.-H. Frömming

2. Referent: Prof. Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung:

1. November 1967

Tag der Promotion:

22. DEZ. 1967

Vergleichende Untersuchungen über die
Oxydation von Monohydroxy- und
o-Dihydroxybenzolen durch Phenoloxydase

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

Überreicht von
Gerhard Mues
aus Berlin

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026



Gewidmet Herrn Werner Vüllgraf

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. K.-H. Frömming am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Herrn Professor Dr. K.-H. Frömming bin ich für die Überlassung des Themas, für wertvolle Hinweise bei der Durchführung der Arbeit, für die Unterstützung beim Literaturstudium und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion sich ergebender Probleme zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. G. Schenck danke ich herzlich für die Unterstützung und das Interesse, das er meiner Arbeit und meiner wissenschaftlichen Fortbildung jederzeit entgegengebracht hat.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Allgemeiner Teil	5
I. System Phenol/Brenzkatechin	5
1) Spektralphotometrische Messungen	6
a) im kurzwelligen Bereich	6
b) im langwelligen Bereich	8
2) Bildung von Additionsprodukten	11
3) Manometrische Messungen	12
4) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	16
a) Oxydation des Brenzkatechins	16
b) Oxydation des Phenols	18
c) Oxydation von Phenol/Brenzkatechingemischen	20
d) Oxydation des Phenols mit anschließendem Zusatz von Ascorbinsäure	20
e) Spektralphotometrische Untersuchung der Rf-Werte	22
5) Untersuchungen über das Reaktionsprodukt Rf 0,73 der Phenoloxydation	23
6) Nichtenzymatische Untersuchungen der Reaktion zwischen Phenol und o-Benzochinon	29
II. System 4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure)/3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeensäure)	32
1) Spektralphotometrische Messungen	32
a) im kurzwelligen Bereich	32
b) im langwelligen Bereich	34
2) Manometrische Messungen	34
3) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	38
a) Oxydation der Kaffeensäure	39
b) Oxydation der p-Cumarsäure	41
c) Oxydation einer Mischung von p-Cumarsäure und wenig Kaffeensäure	43
d) Spektralphotometrische Untersuchung der Rf-Werte	43
e) Bildung von Kaffeensäure im System Enzym/p-Cumarsäure/Ascorbinsäure	43
4) Versuch der Bildung von Additionsprodukten	46
C. Zusammenfassung und Diskussion	48
D. Experimenteller Teil	51

Monophenolasezentrums beim Präparationsprozeß erklärt. Die von KERTESZ (10) 1952 aufgestellte Theorie, daß die Oxydation der Monophenole eine nichtenzymatische sei, hervorgerufen durch freie, nicht an Protein gebundene Metallionen, die eine Reaktion zwischen Chinonen und Monophenolen katalysieren, glaubte MASON (11) widerlegt zu haben, als er mit Sauerstoff ^{18}O bewies, daß die Wirkung gegenüber Monophenolen eine direkte Sauerstoffübertragung war, und daß der Sauerstoff aus der Luft stammte, und nicht aus dem Wasser, wie KERTESZ es formuliert hatte.

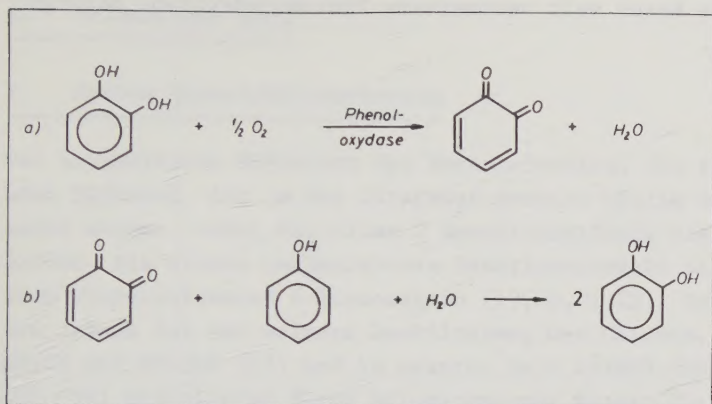
Die Frage der Hydroxylierung der Monophenole ist auch heute noch heftig umstritten. Die beiden entgegengesetzten Meinungen werden vor allem von 2 Arbeitskreisen vertreten. MASON und Mitarbeiter, die an frühere Arbeiten (12,13) anschlossen, vertreten eine direkte enzymatische Hydroxylierung, während KERTESZ die bereits früher (14) vermutete oxydierende Wirkung der gebildeten Chinone auf Monophenole vertritt und jede Reaktion zwischen Enzym und Monophenol ablehnt.

Die Arbeiten MASONS (11,15) deuten die Hydroxylierung wie folgt:

Da ein Zusatz eines Diphenols die bei jedem Monophenol auftretende Induktionszeit zum Verschwinden bringt, ist auch bei der Oxydation des Monophenols ohne jeden Zusatz das gebildete Diphenol die eigentlich wichtige Komponente. Geringste, analytisch nicht nachweisbare Spuren des Diphenols, die autoxydativ aus dem Monophenol gebildet werden, aktivieren das "Cresolasezentrum" des Enzyms derart, daß das Enzym jetzt direkt das Monophenol hydroxyliert.

KERTESZ dagegen (16,17,18), der die indirekte nichtenzymatische Hydroxylierung des Monophenols vertritt, sieht den Mechanismus anders:

Ohne daß es zu einer Reaktion zwischen Chinon und Enzym kommt, oxydiert das Chinon z.B. das Phenol zum Brenzkatechin, wie es in dem folgenden Schema angegeben ist.



In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage untersucht werden, inwieweit bei der enzymatischen Oxydation einiger Mono- und Diphenole ein paralleler Reaktionsverlauf beobachtet werden kann. Wir können als gesichert annehmen, daß bei der Einwirkung der Phenoloxydase auf monophenolische Verbindungen eine Hydroxylierung zum entsprechenden o-Dihydroxybenzol eintritt. Ob die weitere Reaktion so abläuft, wie es bei der Oxydation des Diphenols allein der Fall ist, wird meist vermutet, ist aber noch nicht bewiesen. Daß in dieser Hinsicht bisweilen Unterschiede zu bestehen scheinen, wurde in unserem Arbeitskreis besonders bei der Einwirkung der Phenoloxydase auf das Morphin deutlich. Morphin wird von dem Enzym allein nicht oxydiert. In Gegenwart von 4-Hydroxyzimtsäure konnte Pseudomorphin als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden, in Anwesenheit von 3,4-Dihydroxyzimtsäure war diese Verbindung nicht nachzuweisen. Es ist zu berücksichtigen, daß das Enzym bei der Oxydation von Monophenolen nach begonnener Hydroxylierung auf ein Gemisch von Mono- und Diphenolen einwirkt, wobei allerdings der letzte Partner in sehr geringer Konzentration vorliegt.

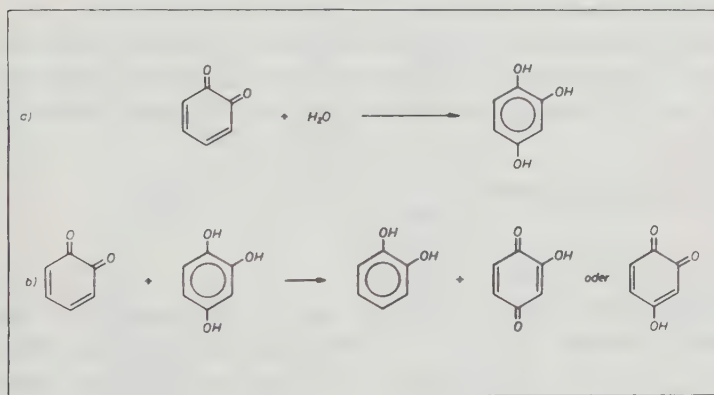
Als Untersuchungsmethode für die Verfolgung der Oxydation sollten die Manometrie, die Spektralphotometrie und die Dünnschichtchromatographie herangezogen werden. Als Substrate wurden einmal das System Phenol/Brenzkatechin als einfachste Phenole und zum anderen das System 4-Hydroxyzimtsäure/3,4-Dihydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure/Kaffeesäure) als

in der Natur weit verbreitete Zimtsäurederivate herangezogen.

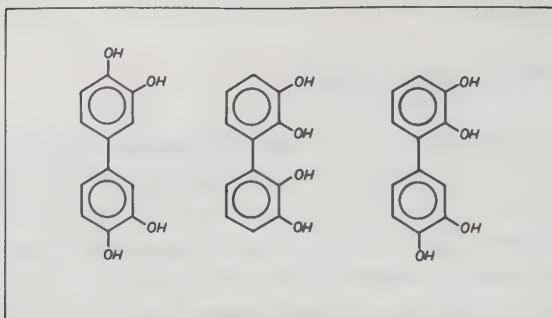
B. Allgemeiner Teil

I. System Phenol/Brenzkatechin

Die enzymatische Oxydation des Brenzkatechins, als einfachstem Diphenol, ist in der Literatur bereits häufig untersucht worden, wobei vor allem 2 Reaktionsabläufe diskutiert werden. Als erstes nachweisbares Reaktionsprodukt bildet sich übereinstimmend o-Benzochinon (19,20,21,22). Umstritten jedoch ist der weitere Reaktionsweg des Chinons. WAGREICH und NELSON (23) und in neuerer Zeit DAWSON und TARPLEY (24) postulieren durch Anlagerung von Wasser die intermediäre Bildung von 1,2,4-Trihydroxybenzol, das dann weiter durch o-Benzochinon oxydiert wird.



MASON lehnt diesen Reaktionsweg ab (22,25); er glaubt, daß das o-Benzochinon direkt polymerisiert. FORSYTH und QUESNEL konnten 1957 bei Verwendung recht hoher Brenzkatechinkonzentrationen die Bildung von 3 isomeren Tetrahydroxydiphenylen nachweisen, die ihrer Meinung nach durch eine Radikalreaktion entstanden waren (26,27). Die folgende Abbildung zeigt die 3 Tetrahydroxydiphenyle, deren Entstehung auch durch Untersuchungen von BOUCHILLOUX und LISSITZKY (28,29) bestätigt wurde.



Entsprechende Untersuchungen über den Reaktionsverlauf der enzymatischen Phenoloxydation liegen bisher noch nicht vor. Als einziger berichtet HERRMANN (30), daß er Brenzkatechin und dessen Folgeprodukte bei der enzymatischen Oxydation des Phenols erhalten habe.

Es sollte zunächst untersucht werden, ob spektralphotometrisch, manometrisch und chromatographisch eine Übereinstimmung der Oxydation des Phenols und des Brenzkatechins feststellbar ist.

1. Spektralphotometrische Messungen

a. im kurzwelligen Bereich

Die Oxydation wurde bei pH 6,0 und 5,2 durchgeführt. Höhere pH-Werte wurden wegen der starken Autoxydation des Brenzkatechins nicht herangezogen. Die Spektren der Reaktionslösungen wurden in größeren Zeitabständen gegen eine Vergleichslösung gemessen, die sich vom Reaktionsansatz nur durch das Fehlen des Phenols bzw. des Brenzkatechins unterschied.

Die Abb. 1 und 2 zeigen die UV-Spektren des bei pH 6,0 oxydierten Phenols bzw. des Brenzkatechins.

Bei der Oxydation des Phenols verschwindet das Maximum bei 270 nm allmählich unter Extinktionsabfall und geringfügiger Verschiebung nach λ 265 nm (Abb.1).

Ein entsprechendes Spektrum bildet sich bei der Oxydation des Brenzkatechins aus, mit dem Unterschied, daß die Oxydation erheblich schneller abläuft als beim Phenol. Dies ist

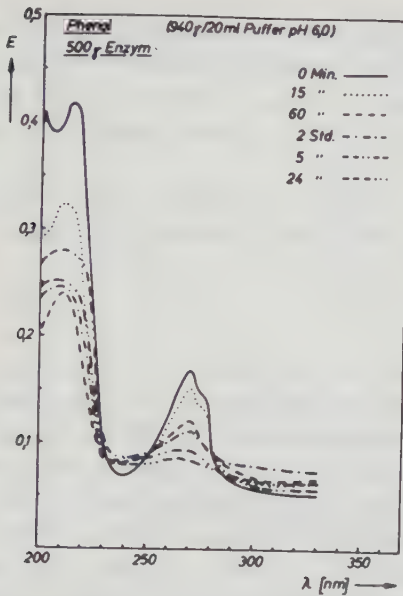


Abb. 1. Oxydation des Phenols bei pH 6,0

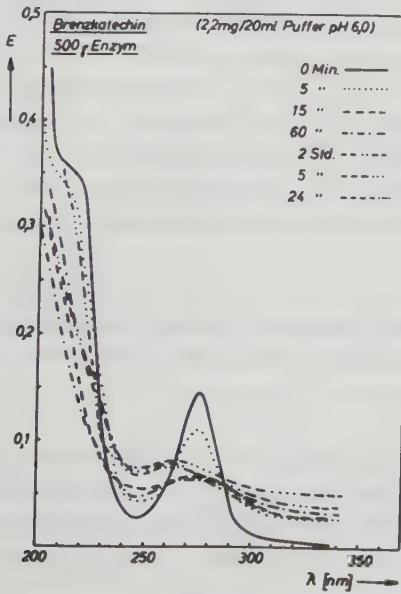


Abb. 2. Oxydation des Brenzkatechins bei pH 6,0

verständlich, da Brenzkatechin ohne Induktionsperiode oxydiert wird. Das Spektrum nimmt nach einiger Zeit einen uncharakteristischen Verlauf, wie wir ihn aus der Abb. 1 bei der Oxydation des Phenols kennen, wahrscheinlich typisch für polymere Oxydationsprodukte des Systems Phenol/Brenzkatechin (Abb. 2).

Bei pH 5,2 ist das pH-Optimum des Enzyms schon stark überschritten, so daß die Oxydation langsamer verläuft. Das zeigte sich besonders beim Phenol.

b. im langwelligen Bereich

In den Abb. 3a - d sind die Spektren der bei pH 6,0 und 5,2 oxydierten Lösungen abgebildet. Das in der Literatur (31,32) beschriebene o-Benzochinon-Maximum bei 390 nm bildet sich bei der enzymatischen Oxydation des Brenzkatechins sofort nach Einsetzen der Oxydation und verschwindet wegen der Instabilität der o-Chinone in wäßriger Lösung im Laufe der ersten Stunde. Setzt man nach dieser Zeit der bei pH 6,0 oxydierten Lösung nochmals Enzym zu, so bildet sich kein Maximum bei 390 nm mehr aus, was als Beweis dafür anzusehen ist, daß alles Brenzkatechin oxydiert wurde. Führt man den gleichen Versuch bei pH 5,2 durch, so bildet sich nach nochmaliger Enzymzugabe ein erneutes schwaches Maximum bei 390 nm aus, was als Beweis dafür angesehen werden kann, daß durch die geringe Enzymaktivität in diesem pH-Bereich noch nicht oxydiertes Brenzkatechin übriggeblieben war, das von dem neu zugegebenen Enzym zum o-Benzochinon oxydiert wurde.

Bei der Oxydation des Phenols bildete sich das gleiche Maximum erst bei Einsatz stärkerer Enzymkonzentrationen, da erst dann eine ausreichende o-Benzochinon-Konzentration vorliegt. Dieses Maximum verschwindet ebenfalls relativ schnell.

Mit dem Auftreten dieses Maximums bei der enzymatischen Oxydation des Phenols ist bewiesen, daß als Primärreaktion eine enzymatische Umwandlung des Phenols zum Brenzkatechin und eine anschließende Oxydation zum o-Benzochinon erfolgt.

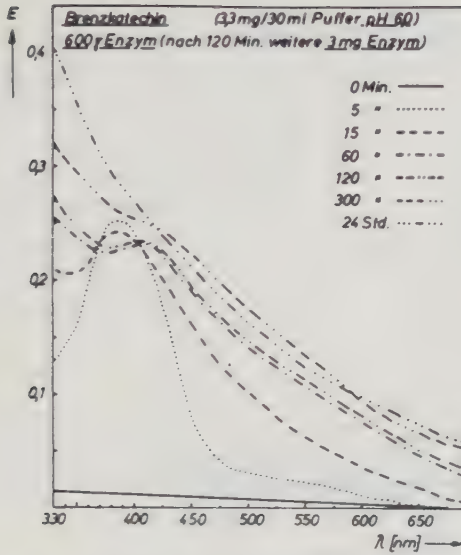


Abb. 3a. Oxydation des Brenzkatechins bei pH 6,0

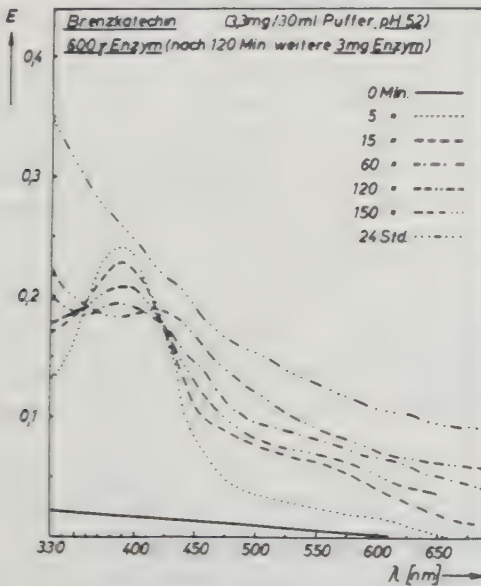


Abb. 3b. Oxydation des Brenzkatechins bei pH 5,2

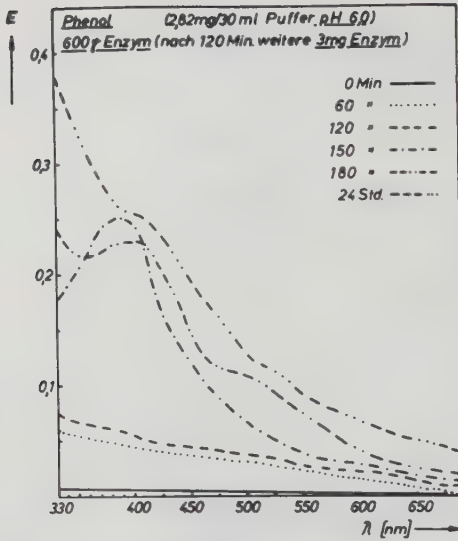


Abb. 3c. Oxydation des Phenols bei pH 6,0

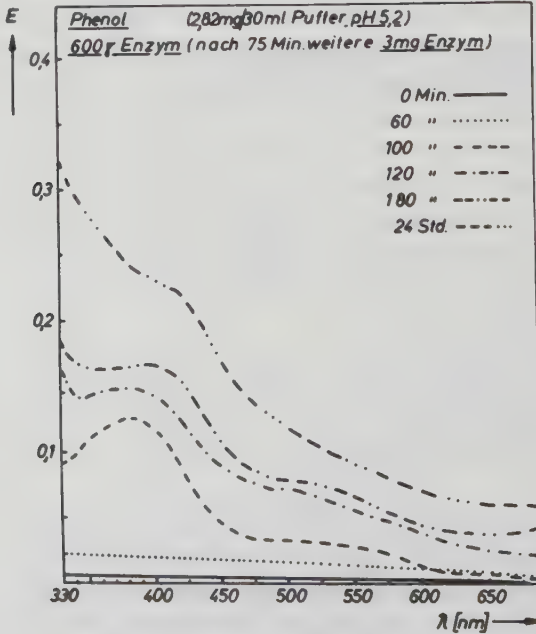
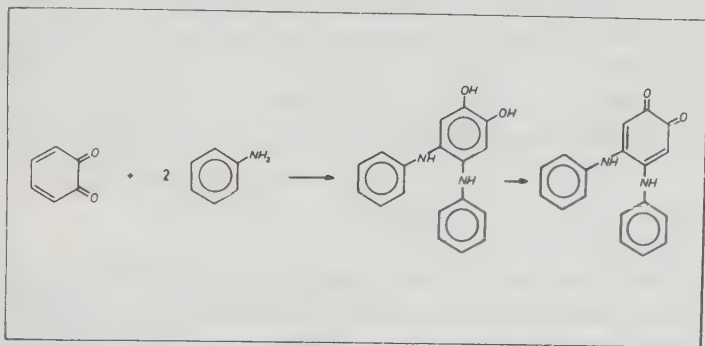


Abb. 3d. Oxydation des Phenols bei pH 5,2

2. Bildung von Additionsprodukten

Nachdem auf spektralphotometrischem Wege der Nachweis einer Chinonbildung bei der enzymatischen Tyrosinaseoxydation des Phenols gelungen war, sollte versucht werden, das o-Benzochinon durch Reaktion mit einer H-aciden Verbindung in ein kristallines Produkt zu überführen. Hierfür ist unter anderem Anilin verwendet worden (33,34,35), das sich an das o-Benzochinon zum 4,5-Dianilino-1,2-Brenzkatechin addiert, das dann zum entsprechenden Chinon weiteroxydiert wird.



Ausgegangen wurde von hohen Enzym- und Anilinkonzentrationen, um eine rasche und vollständige Oxydation und eine ebenso vollständige Umsetzung zwischen den Chinonen und dem Anilin zu gewährleisten. Nach dem Einleiten von Luft in die Reaktionsgefäße färbten sich beide Lösungen - die phenolische nach einer kurzen Verzögerung - intensiv dunkelrot. Nach etwa 15 Minuten fiel ein kristalliner rotvioletter Niederschlag aus. Nach dem Reinigen und Umkristallisieren waren die Schmelzpunkte beider Substanzen identisch; sie lagen bei 188-190°. (Literatur-Fp: 190-191°) (36).

Die Analyse ^{x)} für das Dianilinobenzochinon C₁₈H₁₄O₂N₂ ergab:

Berechnet: C: 74,46
H: 4,86
N: 9,64

^{x)} Die Analyse wurde im mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mülheim/Ruhr, durchgeführt.

Gefunden: (aus Phenol) C: 74,48

H: 5,02

N: 9,41

(aus Brenzkatechin) C: 74,51

H: 5,04

N: 9,35

Dies ist ein weiterer Beweis, daß o-Benzochinon als Oxydationsprodukt des Phenols gebildet wird.

Solche Additionsreaktionen mit dem Enzymeiweiß dürften auch bei der Niederschlagsbildung eine Rolle spielen, die bei längerer enzymatischer Oxydation der beiden Verbindungen auftritt. Nach salzsaurer Hydrolyse der gebildeten Niederschläge konnten papierchromatographisch die gleichen Aminosäuren nachgewiesen werden, die nach der Hydrolyse des Enzyms allein auftraten.

3. Manometrische Messungen

=====

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs in der Warburgapparat wurden verschiedene Substratkonzentrationen (9×10^{-3} / 9×10^{-4} und 9×10^{-5} M) bei den pH-Werten 6,0 und 5,2 mit der gleichen Enzymkonzentration wie bei der spektralphotometrischen Untersuchung oxydiert. Die Ergebnisse des Versuchs bei pH 6,0 zeigen die Abb. 4 und 5. In Abb. 4 erkennt man die typische Induktionsperiode des Phenols. Weiter fällt der gegenüber der Brenzkatechinoxidation wesentlich stärkere Sauerstoffverbrauch auf, der wohl auf die zur Hydroxylierung benötigte größere Sauerstoffmenge zurückzuführen ist. In Abb. 5 ist die Oxydation des Brenzkatechins durch die Inaktivierung des Enzyms (37,38) bereits nach etwa einer Stunde beendet, während beim Phenol dieser Vorgang erst nach etwa 5-6 Stunden unter den gewählten Reaktionsbedingungen eintritt.

Wurde die Oxydation bei pH 5,2 verfolgt, so war der Unterschied in der Sauerstoffaufnahme zwischen den beiden Phenolen geringer als bei pH 6,0. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß bei pH 5,2 die Oxydation wegen der geringeren Enzymaktivität nicht vollständig abläuft.

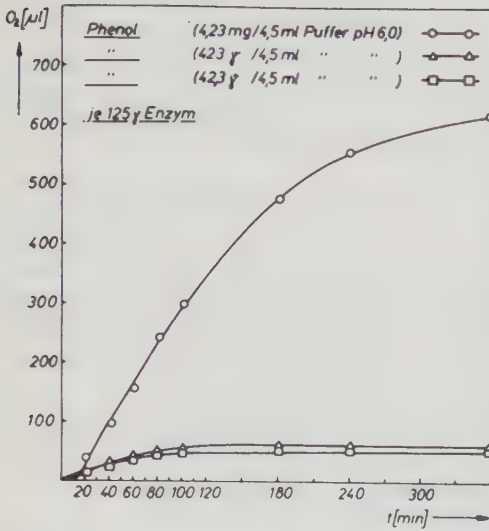


Abb. 4. Oxydation des Phenols bei pH 6,0

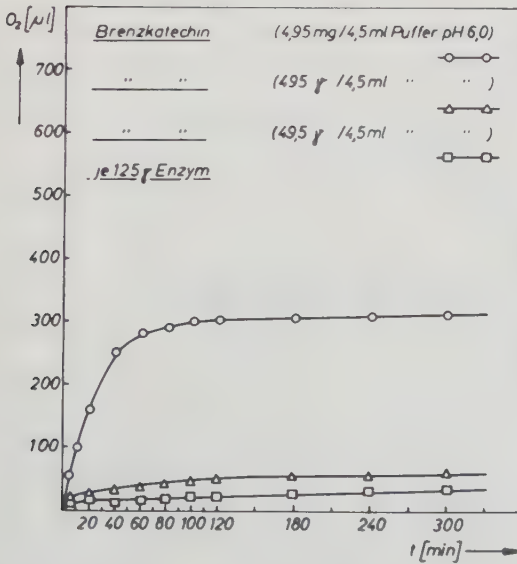


Abb. 5. Oxydation des Brenzkatechins bei pH 6,0

Im weiteren sollte der Einfluß geringer Mengen Brenzkatechin auf den Verlauf der Phenoloxydation untersucht werden. Es werden hiermit die Verhältnisse nachgeahmt, die einige Zeit nach Beginn der enzymatischen Oxydation des Phenols vorliegen, nachdem sich eine geringe Menge Brenzkatechin gebildet hat.

Abb. 6 zeigt, daß eine 9×10^{-6} M Lösung von Brenzkatechin keinen Sauerstoffverbrauch mehr zeigt. Die 9×10^{-3} M Lösung des Phenols ohne Brenzkatechinzusatz wird erst nach einer Induktionsperiode von etwa 20 Minuten oxydiert. Bei der Oxydation des Gemischs (Phenol 9×10^{-3} /Brenzkatechin 9×10^{-6} M Lösung) beginnt die Oxydation sofort.

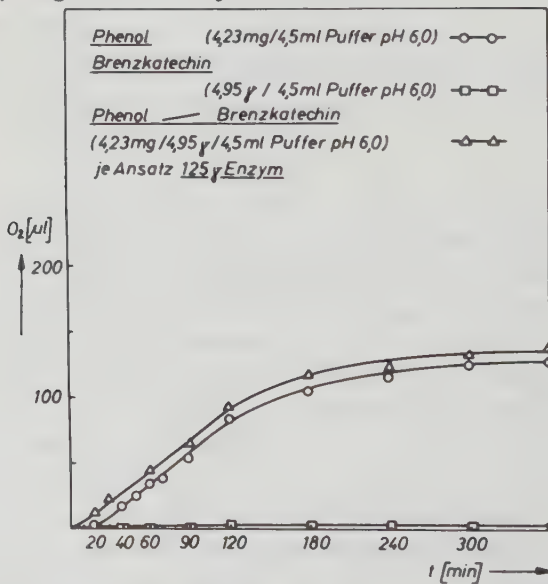


Abb. 6. Oxydation des Phenols bei pH 6,0 in Gegenwart von Spuren Brenzkatechin

In einem zweiten Versuch wird die geringe Menge Diphenol aus einer zweiten Ansatzbirne des Warburggefäßes erst nach zwanzigminütiger Einwirkung des Enzyms auf das Phenol zugegeben. Mit der Zugabe des Brenzkatechins tritt eine verstärkte Oxydation ein, die Kurve steigt an, ausgelöst durch die Spuren des Substrats Brenzkatechin (Abb. 7).

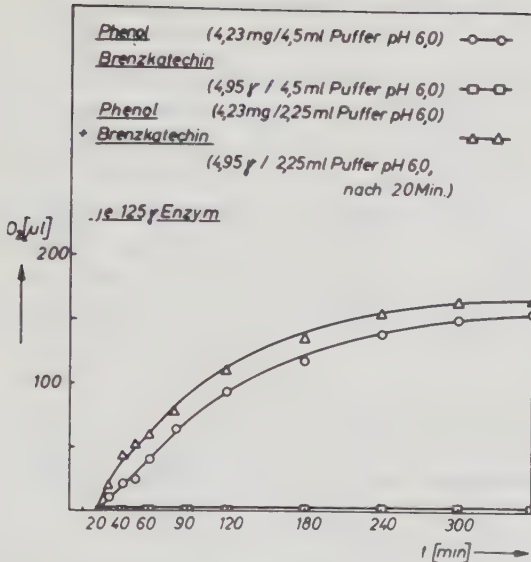


Abb. 7. Oxydation des Phenols bei pH 6,0 bei Zugabe der Spuren Brenzkatechin nach 20 Minuten Reaktionszeit

Die manometrischen Ergebnisse zeigen, daß bei Vorliegen geringer Mengen Brenzkatechin eine Erhöhung der Oxydationsgeschwindigkeit in dem System Tyrosinase/Phenol eintritt. Worauf die hier aufgehobene Induktionsperiode zurückgeführt werden kann, ist noch nicht mit Sicherheit geklärt. KHARKANIS und FRIEDEN (39) machen einen Protein-Inhibitor dafür verantwortlich. In Anwesenheit von Diphenolen könnte das enzymatisch gebildete o-Chinon mit dem Inhibitor in Reaktion treten, indem es ihn als Aminderivat addiert. Die Spuren Diphenol, die die Induktionsperiode verkürzen können, brauchen dieser Theorie nicht zu widersprechen, da sofort mit Beginn der Cresolaseaktivität des Enzyms weiteres o-Diphenol durch Hydroxylierung des Monophenols entsteht.

Ebenso könnte man daran denken, daß durch eine katalytische Menge o-Diphenol eine Aktivierung des Cresolasezentrums des Enzyms erfolgt (11,15). Eine derartige Erklärung geben FOX und BURNETT (40) für die durch o-Diphenole bewirkte Aktivierung eines als Protyrosinase bezeichneten latenten Enzyms von *Neurospora crassa*.

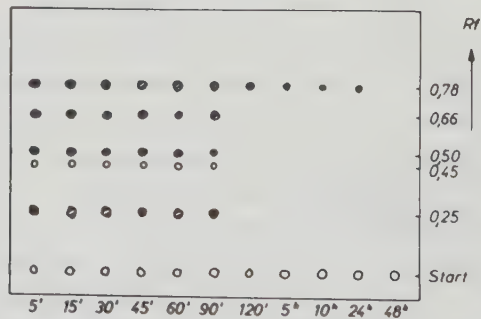
4. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Auf dünnschichtchromatographischem Wege sollte der Verlauf der Oxydation des Phenols und des Brenzkatechins verfolgt und festgestellt werden, ob in beiden Fällen gleiche Oxydationsprodukte nachweisbar sind.

Als Adsorbens wurde Zellulose gewählt, da Kieselgel einen oxydativen Einfluß auf die Substanzen hatte, die sich beim Auftragen bereits dunkel verfärbten. Als Laufmittel wurde 15% Essigsäure gewählt, mit der man relativ günstige Trennungen erhielt.

a. Oxydation des Brenzkatechins

Abb. 8 zeigt das Rf-Diagramm, das bei der Oxydation einer Brenzkatechinlösung (44mg/40 ml Puffer) bei pH 6,0 erhalten wurde.



Brenzkatechin (44mg/40ml Puffer, pH 6,0)
 + 1mg Enzym, nach 90Min. erneute Zugabe von
10mg Enzym
Rf 0,78: Brenzkatechin bzw. sein Oxydationsprodukt
Rf 0,66/0,50/0,45/0,25: Zwischenprodukte
Start: Polymerisate

Abb. 8. Oxydation einer Brenzkatechinlösung bei pH 6,0

Der Brenzkatechinfleck Rf 0,78, mit diazotierter Benzidinlösung (41) gelbbraun anfärbbar, ist bis zum Schluß der Reaktion nachweisbar. Allerdings ist die Zone nach einer Reaktionszeit von mehr als 90 Minuten auch ohne Besprühen schon schwach bräunlich gefärbt und färbt sich dann beim Ansprühen intensiv braun. Es sei darauf hingewiesen, daß nach die-

ser Zeit nochmals die zehnfache Enzymmenge zugesetzt wurde. Wie wir aus einer spektralphotometrischen Kurve ersehen werden, verändert sich im Laufe der Zeit das Spektrum des Eluats dieser Zone. Reinsubstanz und Oxydationsprodukt haben offensichtlich den gleichen Rf-Wert. Während am Startfleck Polymerisationsprodukte liegen bleiben, treten bereits nach fünfminütiger Reaktion 4 weitere Flecken auf: der eine, Rf 0,45, ist im UV-Licht nur ganz schwach fluoreszierend zu erkennen und färbt sich beim Besprühen nicht an, die anderen Zonen (Rf 0,66; 0,50; 0,25) sind unter der UV-Lampe nicht sichtbar, färben sich aber beim Besprühen mit diazotierter Benzidinlösung (41) braun. Diese Produkte verschwinden nach der erneuten Enzymzugabe. Die Tatsache, daß diese Flecken nach dem Entwickeln des Chromatogramms nicht zu erkennen sind und sich erst beim Besprühen anfärben, deutet darauf hin, daß es sich um phenolische Produkte handelt, da sie ja mit dem diazotierten Reagenz zum Farbstoff kupeln. Ob es sich hierbei um die von FORSYTH und QUESNEL (26,27) beschriebenen farblosen Tetrahydroxydiphenyle handelt, wurde nicht weiter untersucht. Auch bei der Oxydation einer geringeren Substratmenge (4,4 mg/40 ml Puffer) traten die gleichen Ergebnisse auf. Wegen des gegenüber dem Substrat vorliegenden Enzymüberschusses ist allerdings die Substanz mit dem Rf-Wert 0,78 nach 5 Stunden nicht mehr nachweisbar.

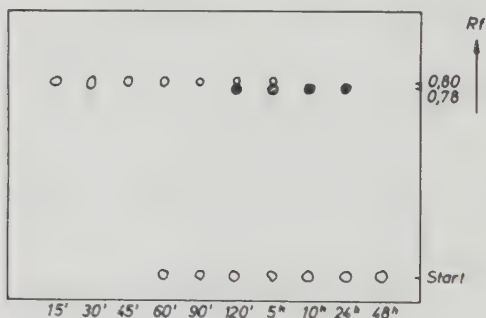
Wurde die Substratkonzentration noch weiter verringert (440 γ /40 ml Puffer), so waren außer dem Fleck mit dem Rf-Wert 0,78, also dem Brenzkatechin, keine weiteren Produkte zu erkennen. Dies würde mit den Beobachtungen FORSYTHS und QUESNELS (26,27) übereinstimmen, die bei geringen Substratkonzentrationen ($< 5 \times 10^{-4}$ M) außer einem nicht identifizierbaren roten Fleck keine weiteren Verbindungen fanden.

In der gleichen Weise wurde bei pH 5,2 die Oxydation verfolgt. Da das Optimum der Enzymaktivität bei pH 5,2 schon überschritten ist, sind sämtliche Reaktionsprodukte auch am Ende der Reaktion noch zu erkennen. Die weitere Umwandlung zu polymeren Gebilden scheint nicht so schnell vonstatten zu gehen, was auch an der geringen Niederschlagsbildung beim Ansäuern der dem Reaktionsansatz entnommenen Proben zu er-

kennen ist.

b. Oxydation des Phenols

Der relativ kurzen Induktionsperiode wegen verfärbt sich eine Phenollösung (37,6 mg/40 ml Puffer) bei pH 6,0 bei der Oxydation schon nach etwa 15 Minuten. In Abb. 9 sind aber gegenüber dem Rf-Diagramm des Brenzkatechins deutliche Unterschiede zu erkennen.

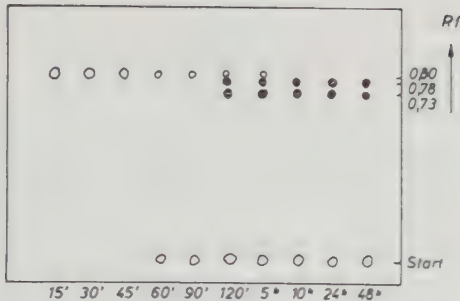


Phenol (37,6 mg/40 ml Puffer pH 6,0)
 + 1 mg Enzym, nach 90 Min. erneute Zugabe von
 10 mg Enzym
Rf 0,80: Phenol
Rf 0,78: Brenzkatechin bzw. sein Oxydationsprodukt
Start: Polymerisat

Abb. 9. Oxydation einer Phenollösung bei pH 6,0

Phenol, das sich mit diazotierter Benzidinlösung (41) zitronengelb färbt, ist nur beim Auftragen großer Mengen als unscharfe, zerfließende Zone (Rf 0,80) sichtbar. Nach 2 Stunden entsteht ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,78, der dem des Brenzkatechins entspricht und sich ebenso auch ohne Anfärben schwach braun verfärbt und dann beim Besprühen dunkler wird. Nach 24 Stunden ist er nicht mehr sichtbar. Dagegen fehlen sämtliche Flecken, die bei der Oxydation des Brenzkatechins auftraten.

Noch interessanter waren die Ergebnisse bei der Oxydation einer Phenollösung (37,6 mg/40 ml Puffer) bei pH 5,2. Die Induktionsperiode dauerte etwa 45 Minuten und beim Inhibieren der dem Ansatz entnommenen Proben mit N-Salzsäure bildete sich nur ein sehr geringer polymerer Niederschlag.



Phenol (376mg/40 ml Puffer, pH 5,2)
 + 1mg Enzym, nach 90 Min. erneute Zugabe von
 10mg Enzym
Rf 0,80 Phenol
Rf 0,78 Brenzkatechin bzw sein Oxydationsprodukt
Rf 0,73 unbekanntes Zwischenprodukt
Start Polymerisate

Abb. 10. Oxydation einer Phenollösung bei pH 5,2

Abb. 10 zeigt das Entstehen des schwach verfärbten und dann braun ansprühbaren Flecks Rf 0,78, der hier bis zum Ende der Reaktion sichtbar bleibt, und bei dem es sich um Brenzkatechin und dessen Oxydationsprodukt handeln sollte. Das nach dem Ansprühen gelb gefärbte Phenol ist etwa 10 Stunden lang zu beobachten. Überraschenderweise entstand aber zugleich mit dem Fleck des Brenzkatechins ein beim Ansprühen gelb gefärbter Fleck Rf 0,73, der nach einiger Zeit etwas nachdunkelte. Ebenso wie der Brenzkatechinfleck bleibt er bis zum Schluß sichtbar. Wie bei der vorhergehenden Untersuchung sind alle anderen Flecken der Brenzkatechinoxidation nicht auffindbar.

Bei der enzymatischen Oxydation einer Phenollösung mit geringerer Substratkonzentration (3,76 mg/40 ml Puffer) bei pH 5,2 wurden die entsprechenden Ergebnisse erhalten. Zunächst schwach, dann stärker, bildet sich sofort nach Beendigung der Induktionsperiode der Fleck Rf 0,78. Gegen Ende der Reaktion wird er wieder schwächer und verschwindet nach 10 Stunden. Das Phenol ist nach etwa 2 Stunden völlig oxydiert, und nach 1/2 Stunde entsteht auch, zunächst schwächer, aber dennoch deutlich sichtbar, der beim Besprühen gelb

färbbare, dann nachdunkelnde Fleck Rf 0,73. Verschwindet das Phenol aus dem System, ist er ebenfalls nicht mehr sichtbar.

c. Oxydation von Phenol/Brenzkatechingemischen

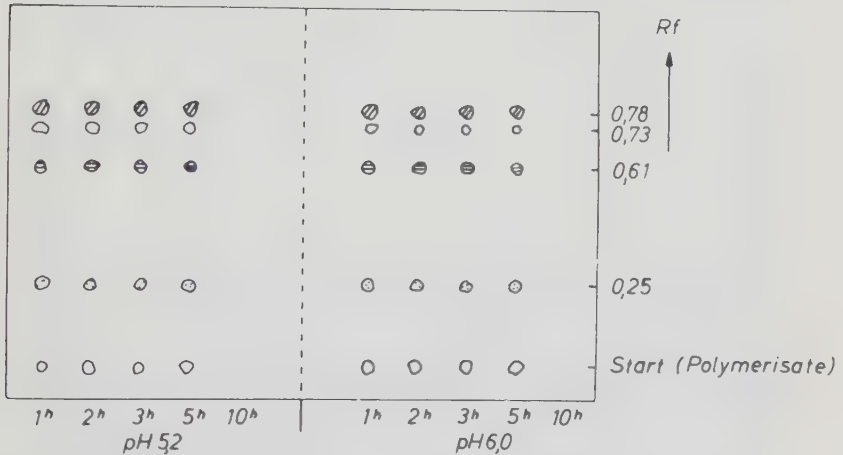
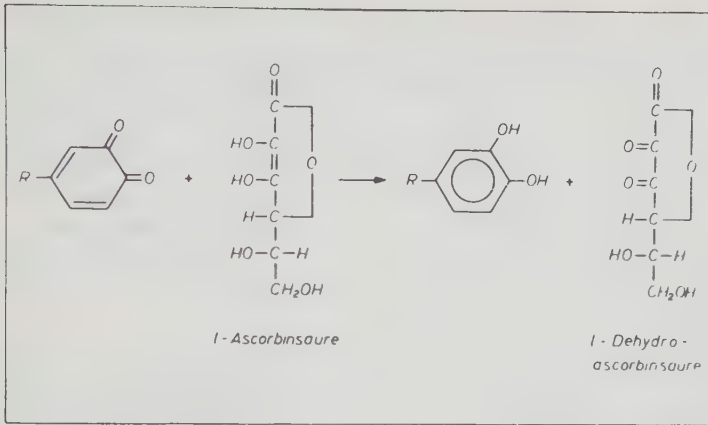
Entsprechend der oben beschriebenen Beobachtung, daß bei der Oxydation einer Brenzkatechinlösung ($< 5 \times 10^{-4}$ M) keine Folgeprodukte sichtbar sind, ergab die Oxydation eines Gemischs einer Phenol- und Brenzkatechinlösung (37,6 mg Phenol und 440 γ Brenzkatechin in 40 ml Puffer) bei pH 5,2 ein Rf-Diagramm, das dem in Abb. 10 ähnelte. Es zeigte also keine Oxydationsprodukte des Brenzkatechins. Erhöhte man dagegen die Brenzkatechinkonzentration in dieser Mischung um das zehnfache, erhielt man ein Rf-Diagramm, in dem neben den Folgeprodukten der Brenzkatechinoxidation gleichzeitig der nur bei der phenolischen Oxydation bei pH 5,2 nachweisbare Fleck mit dem Rf-Wert 0,73 zu erkennen ist.

d. Oxydation des Phenols mit anschließendem Zusatz von Ascorbinsäure

Die dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen ergaben einen Unterschied im Reaktionsablauf bei der enzymatischen Oxydation des Phenols und des Brenzkatechins bei den von uns verwendeten Enzym- und Substratkonzentrationen.

Um festzustellen, ob nach Zugabe eines Reduktionsmittels die Zwischenprodukte der enzymatischen Brenzkatechinoxidation nachweisbar sind, wurde die enzymatische Oxydation des Phenols bei pH 6,0 und 5,2 wiederholt. Nach Entnahme und Inaktivierung der jeweiligen Proben mit N-Salzsäure wurde zwecks Reduktion der o-Chinone ein Überschuß an Ascorbinsäure zugesetzt.

Die Reaktion zwischen Ascorbinsäure und den o-Chinonen läuft so schnell und quantitativ ab, daß sie von einzelnen Autoren (42) unter Verwendung von Brenzkatechin zur quantitativen Bestimmung der Aktivität der Phenoloxydase verwendet wird.



Phenol (37,6mg/40ml Puffer pH 5,2 bzw. 6,0)

+ 10 mg Enzym

+ 10 mg Ascorbinsäure/1,5ml entnommenes Reaktionsgemisch

Abb. 11. Oxydation einer Phenollösung bei pH 6,0 und 5,2 mit anschließendem Zusatz von 10 mg Ascorbinsäure/1,5 ml entnommener und inaktiverter Reaktionslösung

Abb. 11 zeigt das Rf-Diagramm der enzymatischen Oxydation des Phenols bei pH 6,0 und 5,2 mit anschließendem Zusatz von Ascorbinsäure. Bei pH 5,2 entsteht neben dem Brenzkatechin (Rf 0,78) und dem gelb färbaren Zwischenprodukt

Rf 0,73 innerhalb der ersten 5 Stunden ein neuer Fleck Rf 0,61, der im UV-Licht durch eine rosarote Fluoreszenz auffällt und sich mit diazotierter Benzidinlösung (41) gleichfalls braun anfärben läßt. Bei längerer Oxydation als 5 Stunden ist der Fleck auf dem Chromatogramm nicht mehr zu erkennen, d.h. die Oxydation ist so weit vorgeschritten, daß er selbst bei Zusatz von Ascorbinsäure nicht mehr sichtbar gemacht werden kann. Von den Folgeprodukten der Brenzkatechinoxidation ist nur der Fleck Rf 0,25 nach dem Besprühen schwach zu erkennen.

Die gleichen Ergebnisse zeigten sich, wenn auch wesentlich schwächer, bei pH 6,0. Es konnte nach Zusatz von Ascorbinsäure ebenfalls das gelb anfärbbare Oxydationsprodukt Rf 0,73 nachgewiesen werden. Das Fehlen dieses Flecks bei der enzymatischen Oxydation des Phenols bei pH 6,0 ohne Zusatz des Reduktionsmittels ist auf die bei pH 6,0 stärkere Enzymaktivität zurückzuführen, wodurch eine sofortige weitere Oxydation des anscheinend recht labilen Zwischenprodukts eintritt.

Eine vergleichende Messung der enzymatischen Brenzkatechinoxidation bei pH 6,0 und 5,2 mit anschließendem Zusatz von Ascorbinsäure zeigte uns, daß das oben erwähnte rosarot fluoreszierende Zwischenprodukt Rf 0,61 auch bei der Oxydation des Diphenols auftritt. Es scheint sich hier um eine Substanz zu handeln, die sowohl beim Phenol als auch beim Brenzkatechin gebildet wird, die aber wegen ihrer leichten Oxydierbarkeit ebenfalls nur in Gegenwart von Ascorbinsäure gefaßt werden kann.

e. Spektralphotometrische Untersuchung der Rf-Werte

Wir versuchten, die Spektren der Oxydationsprodukte beider Substrate aufzunehmen, indem wir die Flecken von dem Chromatogramm mit Methanol eluierten. Da schon die Ausgangssubstanzen Phenol und Brenzkatechin nahezu das gleiche Spektrum mit dem für alle Phenole charakteristischen Maximum zwischen 270 und 275 nm besitzen, waren die erhaltenen Absorptionskurven zu uncharakteristisch. Sie zeigten alle mehr oder weniger den gleichen Kurvenverlauf. Er gleicht der 300-Minuten-Kurve in Abb. 12, in der als Beispiel die Spektren

des Brenzkatechinflecks Rf 0,78 nach 1-, 2- und 5-stündiger enzymatischer Oxydation bei pH 6,0 aufgetragen sind. Ebenso ergebnislos waren die Messungen der Spektren im sichtbaren Bereich.

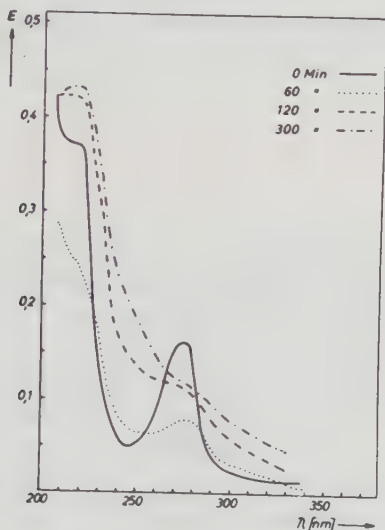


Abb. 12. UV-Spektren des Flecks Rf 0,78 nach 1-, 2- und 5-stündiger enzymatischer Oxydation bei pH 6,0 (in Methanol)

5. Untersuchungen über das Reaktionsprodukt Rf 0,73 der

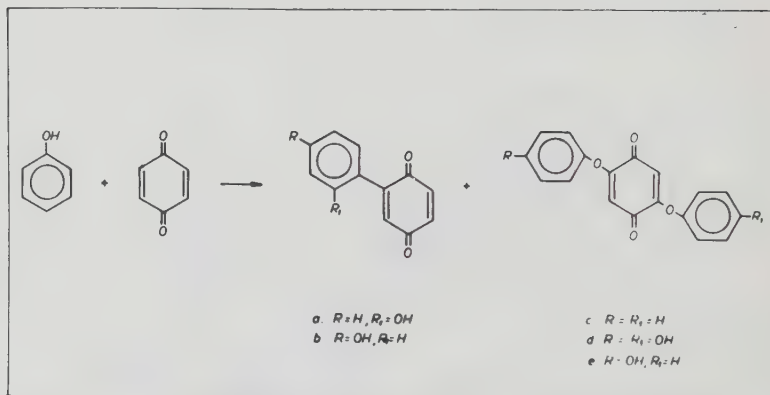
Phenol-Oxydation

Es tauchte nun die Frage auf, worauf das unterschiedliche Oxydationsverhalten des Phenols und des Brenzkatechins zurückzuführen ist. Da der gelb anfärbbare Fleck Rf 0,73 bei der Oxydation des Brenzkatechins allein nicht auftrat, kam der Gedanke, daß es sich um ein Reaktionsprodukt zwischen einem Oxydationsprodukt des Brenzkatechins und dem Phenol handeln könnte. Es sollte daher geprüft werden, ob eine Reaktion zwischen dem o-Benzochinon und dem Phenol eingetreten ist.

o-Chinone können bekanntlich H-acide Verbindungen addieren. So berichteten WAGREICH und NELSON (23) über die Addition von Wasser an o-Benzochinon zum 1,2,4-Trihydroxybenzol.

o-Chinone reagieren mit Aminen, mit Sulfhydrylverbindungen, mit Alkoholen, aber auch mit Phenolen.

Bei der Addition von Phenol an p-Benzochinon treten komplizierte Gemische auf, wobei Verbindungen nachfolgender Art chromatographisch nachgewiesen und synthetisiert werden konnten (43,44).



Es fällt auf, daß das Phenol durch das Chinon bevorzugt in o- oder p-Stellung addiert wird. Nur in neutraler Lösung gewinnt die Reaktion über die Bildung eines Aethers Bedeutung.

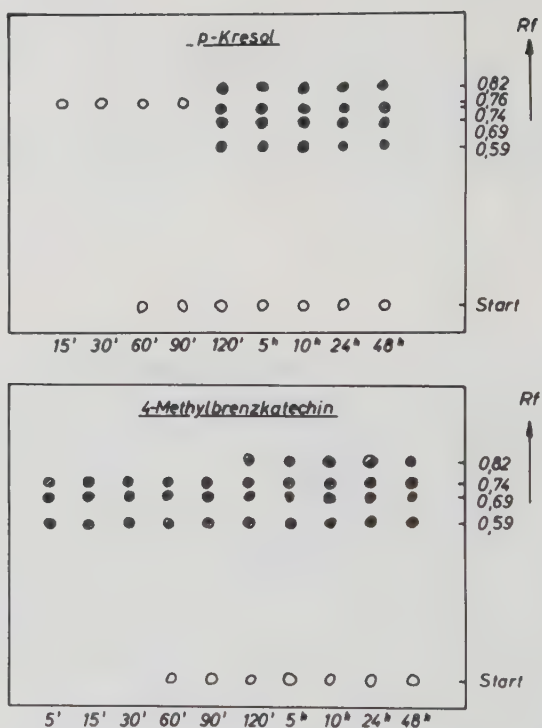
Auch die Bildung der von FORSYTH und QUESNEL (26,27) gefundenen Tetrahydroxydiphenyle läßt sich durch einen Ionenmechanismus erklären, indem eine Addition des Brenzkatechins an das enzymatisch gebildete o-Benzochinon eintritt. Auf eine solche Möglichkeit weisen auch DAWSON und TARPLEY (24) hin.

Eine derartige Addition an o-Chinone kann aber nur erfolgen, wenn die 4-Stellung des o-Benzochinons nicht substituiert ist. Ein Reaktionsprodukt zwischen o-Benzochinon und Phenol könnte durch das nachfolgende Formelbild wiedergegeben werden.



Um festzustellen, ob bei unseren enzymatischen Untersuchungen das gelbe Reaktionsprodukt Rf 0,73 auch auftritt, wenn die 4-Stellung des Phenols substituiert ist, wurden das p-Kresol als Monophenol und das 4-Methylbrenzkatechin als Diphenol mit Tyrosinase oxydiert. Sollte der gelbe Fleck auf die Bildung von 4-Phenoxybrenzkatechin bzw. des daraus entstandenen Chinons zurückzuführen sein, so könnte bei der enzymatischen Oxydation des p-Kresols diese Verbindung nicht gebildet werden, so daß ein entsprechender Fleck bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung nicht auftreten dürfte.

Aus Abb. 13 ist zu ersehen, daß bei der enzymatischen Oxydation einer p-Kresol- bzw. einer 4-Methylbrenzkatechinelösung bei pH 5,2 die gleichen Oxydationsprodukte nachzuweisen sind. Bei der Oxydation des 4-Methylbrenzkatechins [Rf 0,74, mit diazotierter Benzidinlösung (41) braun anfärbbar] werden schon nach 5 Minuten 2 Flecken mit den Rf-Werten 0,59 und 0,69 und nach 2 Stunden ein weiterer Fleck mit dem Rf-Wert 0,82 sichtbar. Alle 3 Folgeprodukte, die sich ebenfalls braun ansprühen lassen, und der Fleck Rf 0,74 der Ausgangssubstanz sind bis zum Schluß der Reaktion zu erkennen. Beim p-Kresol erkennt man die 3 Folgeprodukte (Rf 0,59; 0,69 und 0,82) und den Fleck des "4-Methylbrenzkatechins" Rf 0,74 erstmalig nach 2 Stunden, also nach Zugabe der zehnfachen Enzymmenge. Auch sie sind bis zum Schluß der Oxydation sichtbar. Nach etwa 2 Stunden verschwindet der Fleck des p-Kresols (Rf 0,76), der wie das Phenol gelb besprühbar ist und nur nach dem Auftragen großer Substanzmengen als



p-Kresol (43,2mg/40ml Puffer pH 5,2) bzw.
4-Methylbrenzkatechin (496mg/40ml Puffer pH 5,2)
 * je 1mg Enzym nach 90Min. erneute Zugabe von
 je 10mg Enzym
Rf 0,76 p-Kresol
Rf 0,74 4-Methylbrenzkatechin bzw. sein Oxydationsprodukt
Rf 0,82 / 0,69 / 0,59: weitere Oxydationsprodukte
Start Polymerisate

Abb. 13. Oxydation einer p-Kresol- bzw. 4-Methylbrenzkatechinlösung bei pH 5,2

Zone auftritt.

Die Oxydation bei pH 6,0 ergab ein entsprechendes Ergebnis.

Durch Substitution am C-4 scheint die Möglichkeit einer entsprechenden Reaktion wie beim Phenol also nicht mehr gegeben, die Oxydation verläuft beim 4-Methylphenol (p-Kre-

sol) und 4-Methylbrenzkatechin gleich.

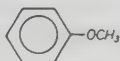
Wie groß die Bedeutung einer freien C-4-Stellung ist, läßt sich anschaulich aus den nachfolgenden vergleichenden Untersuchungen erkennen, wo jeweils Lösungen von Brenzkatechin, 3-Methylbrenzkatechin und 4-Methylbrenzkatechin zusammen mit einer Phenollösung geringerer Konzentration, als die der o-Dihydroxybenzollösungen, bei pH 5,2 enzymatisch oxydiert wurden. Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

- Lösung a) eine Lösung von Brenzkatechin und einer geringeren Menge Phenol
- Lösung b) eine Lösung von 3-Methylbrenzkatechin und einer geringeren Menge Phenol
- Lösung c) eine Lösung von 4-Methylbrenzkatechin und einer geringeren Menge Phenol

Allen Lösungen wurde nach 90 Minuten eine gegenüber der Anfangskonzentration zehnfache Enzymmenge zugesetzt.

Wie erwartet, entstand in den Lösungen a und b nach etwa 1 Stunde der gelb anfärbbare Fleck Rf 0,73, während er auf dem Chromatogramm der Lösung c nicht zu erkennen war. Dies glich vielmehr dem Rf-Diagramm einer oxydierten 4-Methylbrenzkatechinlösung (Abb. 13).

Auch dies bestätigt, daß es, sofern das C-4-Atom nicht substituiert ist, bei genügender Phenolkonzentration zu einer Reaktion zwischen Phenol und o-Chinon zu kommen scheint. Zur weiteren Erhärtung dieser Theorie wurde in den obigen Lösungen a-c das Phenol durch die äquimolare Menge Anisol ersetzt.



Da hier durch die Methoxygruppe die Bildung eines Phenoxyäthers mit dem o-Benzochinon verhindert ist, dürfte der Fleck Rf 0,73 nicht gebildet werden. Eine gewisse Schwierigkeit

rigkeit lag in der Unlöslichkeit des Anisols in wäßrigen Lösungen. So wurde das Anisol zunächst in 1,5 ml Aethanol gelöst und diese alkoholische Lösung den 3 verschiedenen o-Dihydroxybenzol-Puffer-Lösungen zugesetzt. Da Aethanol ebenfalls von Chinonen addiert werden kann (45), bestünde theoretisch die Möglichkeit, daß das postulierte Ausbleiben des gelben Flecks in den 3 Lösungen auch auf eine bevorzugte Reaktion des Chinons mit dem Aethanol zurückzuführen ist. Um festzustellen, ob mit einer derartigen Störung zu rechnen ist, wurden 2 phenolische Lösungen bei pH 5,2 in Gegenwart von je 1,5 ml Aethanol entsprechend enzymatisch oxydiert. Da in beiden Lösungen trotz des Alkoholgehalts der gelbe Fleck, wenn auch schwächer, zu erkennen ist und er bei den 3 anisolhaltigen Lösungen nicht auftritt, wird auch hierdurch die Theorie einer Reaktion zwischen Chinon und Phenol bestätigt.

Die folgende Tabelle gibt noch einmal einen Überblick über das beobachtete Auftreten des gelben Flecks Rf 0,73 bei Verwendung der einzelnen Substrate bzw. Substratgemische:

Substrat, gelöst in je 40 ml Puffer pH 5,2	Bildung des gelben Flecks Rf 0,73
Phenol 37,6 mg	+
Phenol 3,76 mg	+
Phenol 37,6 mg + 1,5 ml Aethanol	+
Phenol 3,76 mg + 1,5 ml Aethanol	+
Phenol 37,6 mg/Brenzkatechin 4,4 mg	+
Brenzkatechin 44,0 mg/Phenol 3,76 mg	+
3-Methylbrenzkatechin 49,6 mg/Phenol 3,76 mg	+
4-Methylbrenzkatechin 49,6 mg/Phenol 3,76 mg	-
Brenzkatechin 44,0 mg/Anisol 4,3 mg + 1,5 ml Aethanol	-
3-Methylbrenzkatechin 49,6 mg/Anisol 4,3 mg + 1,5 ml Aethanol	-
4-Methylbrenzkatechin 49,6 mg/Anisol 4,3 mg + 1,5 ml Aethanol	-

6. Nichtenzymatische Untersuchungen der Reaktion zwischen

Phenol und o-Benzochinon

Mit nichtenzymatisch hergestelltem o-Benzochinon sollte festgestellt werden, ob bei Zugabe von Phenol dünnschichtchromatographisch der gelbe Fleck nachweisbar ist.

Nach der Methode von HORNER und DÜCKHEIMER (46) wurde durch Zugabe von Tetrachlor-o-Chinon zu einer Lösung von Brenzkatechin o-Benzochinon hergestellt. Die Umsetzung mit dem Phenol erfolgte nach MUSSO (43,44) im neutralen und sauren Milieu, wo eine Bildung von Phenoxyäthern zu erwarten ist.

Bei der Chromatographie der Reaktionslösungen sind nach dem Entwickeln mit 15% Essigsäure analog zur enzymatischen Oxydation des Phenols bei pH 5,2 die gleichen Flecke zu erkennen: R_f 0,78, bereits vor dem Besprühen dunkel, dann braun färbbar, also das o-Benzochinon und R_f 0,73, das vermutete Reaktionsprodukt zwischen Phenol und o-Benzochinon, das sich aber hier dunkler anfärbt. Sofern es sich bei dem gelb färbbaren Fleck um das 4-Phenoxybrenzkatechin handelt, das als nicht chinoide Substanz vor dem Besprühen farblos ist, dürfte dieser Fleck das entsprechende o-Benzochinon darstellen. Der Beweis, daß es sich um die genannte Verbindung handelt, wurde durch die Synthese eines Vergleichspräparats nach einer von JANSSEN, VAN ALLAN und WILSON (47) angegebenen Vorschrift erbracht. Das Schema dieser Vorschrift ist auf der nächsten Seite abgebildet.

Es gelang jedoch nicht, ein reines Präparat zu erhalten. Auf dem Dünnschichtchromatogramm zeigte die Verbindung deutlich den gelben Fleck (R_f 0,73); daneben war aber auch ein Brenzkatechinfleck nachweisbar. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß neben der Methylether- auch zum Teil eine Phenyletherspaltung stattfand. Trotz mehrmaliger Versuche gelang es nicht, das 4-Phenoxybrenzkatechin rein zu erhalten, stets war, teils schwächer, teils stärker, Brenzkatechin auf dem Dünnschichtchromatogramm zu sehen (Abb. 14 a).

Die erhaltene Verbindung war sehr instabil; unter der Einwirkung des Luftsauerstoffs traten Umsetzungen ein. So waren nach einigen Tagen Lagerung beim Auftragen der Substanz

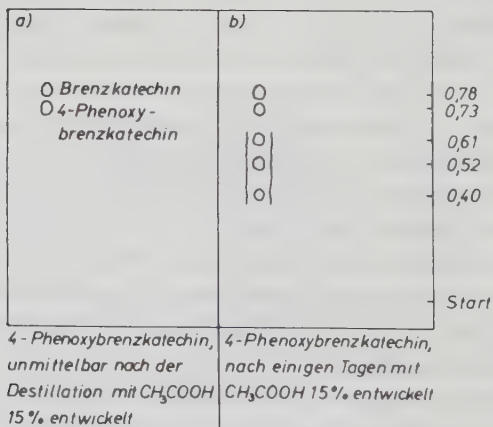
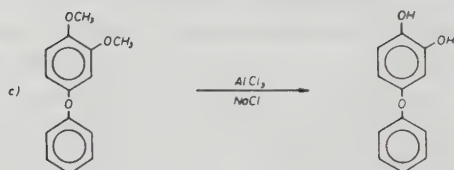
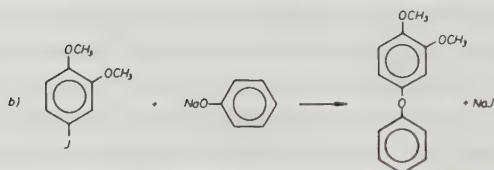
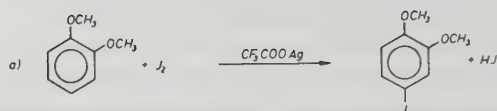


Abb. 14a und b. Rf-Diagramm des synthetisierten 4-Phenoxybrenzkatechins nach der Destillation und nach einigen Tagen Lagerung

unter starker Schwanzbildung 3 weitere Flecke nachweisbar, die sich mit diazotierter Benzidinlösung (41) violettbraun

verfärbten (R_f 0,61; 0,52 und 0,40) (Abb. 14 b).

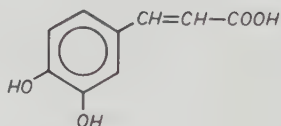
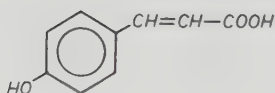
Wir hatten Gelegenheit, eine Probe des 1955 von JANSSEN und Mitarbeitern (47) hergestellten 4-Phenoxybrenzkatechins zu erhalten ^{x)}. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Substanz zeigte Identität mit unserer Verbindung. Durch die lange Lagerung der Verbindung war auch hier eine Umsetzung eingetreten: neben dem Fleck mit dem R_f -Wert 0,73, dem 4-Phenoxybrenzkatechin, waren auch die erwähnten Zonen (R_f 0,61; 0,52 und 0,40) sichtbar und ebenso als Verunreinigung das Brenzkatechin (R_f 0,78).

Wenn es uns auch nicht möglich war, die Entstehung des R_f -Werts 0,73 bei der enzymatischen Oxydation des Phenols bei pH 5,2 mit letzter Sicherheit zu klären, so deuten die genannten Ergebnisse darauf hin, daß bei der enzymatischen Oxydation des Phenols bei pH 5,2 eine Reaktion zwischen Phenol und o-Benzochinon zu einem Phenoxyaether eintritt. Wir glauben, durch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt zu haben, daß die Oxydationen des Phenols und des Brenzkatechins nicht den gleichen Verlauf nehmen, sondern daß sich die Oxydation des Phenols bei pH 5,2 wie die Oxydation eines Gemischs von Brenzkatechin und Phenol verhält. Nachdem durch enzymatische Hydroxylierung ein Teil des Phenols zum Brenzkatechin umgewandelt worden ist, reagiert ein Teil des enzymatisch gebildeten o-Benzochinons mit noch nicht oxydiertem Phenol unter Addition zum 4-Phenoxybrenzkatechin, das seinerseits weiter oxydiert werden kann.

^{x)} Herrn Dr. C.V. WILSON von der Firma Eastman Kodak Co., Rochester USA, sind wir für die Überlassung der Probe zu Dank verpflichtet.

II. System 4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure)/3,4-Dihydro- xyzimtsäure (Kaffeesäure)

Als weiteres System sollte die enzymatische Oxydation der 4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure) und der 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeesäure) untersucht werden.



Beide Verbindungen sind im Pflanzenreich weit verbreitet und kommen als natürliche Substrate der Phenoloxydase in Frage. Sie können durch das Enzym oxydiert werden. Im Hinblick auf die vorhergehenden Untersuchungen im System Phenol/Brenzkatechin interessiert insbesondere die Frage eines parallelen Oxydationsverlaufs, da ja bei der 4-Hydroxyzimtsäure eine Verbindung vorliegt, die in 4-Stellung substituiert ist, so daß eine Addition an das chinoide Oxydationsprodukt ausscheiden sollte.

Die Untersuchungen wurden bei den pH-Werten 6,0 und 6,8 durchgeführt, da beide Substrate im stärker sauren Milieu nur schwer löslich waren.

1. Spektralphotometrische Messungen

a. im kurzwelligen Bereich

Die Spektren der Reaktionslösungen wurden wieder gegen eine Vergleichslösung in größeren Zeitabständen gemessen. Abb. 15 zeigt den Verlauf der Oxydation der p-Cumarsäure bei pH 6,8. Im Verlauf der Reaktion verschwindet das Maximum bei

285 nm, bis die Kurve nach 24 Stunden einen bei allen Versuchen typischen Verlauf nimmt: unter starkem Extinktionsabfall ist noch ein schwaches Maximum bei 290 nm zu erkennen. Bei etwa 320 nm kommt es zur Ausbildung eines isosbestischen Punktes. Dies kann auf das Entstehen nur eines Folgeprodukts hinweisen, was bei der großen Polymerisationsneigung der entstandenen Oxydationsprodukte aber sehr unwahrscheinlich ist. So muß man es sicher auf verschiedene Reaktionsprodukte mit annähernd gleicher Lichtabsorption zurückführen.

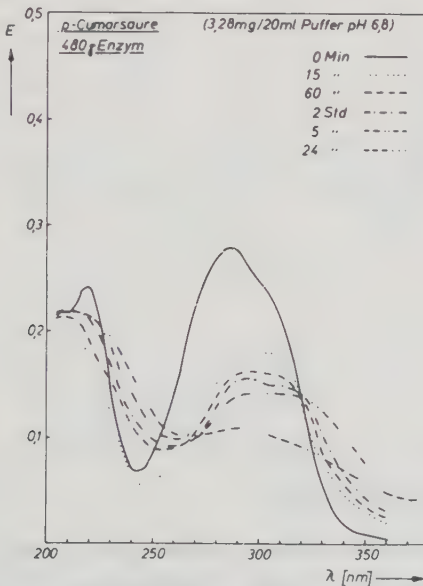


Abb. 15. Oxydation der p-Cumarsäure bei pH 6,8

Vergleichende Messungen im pH-Bereich 6,0 zeigten erst bei niedrigeren Substratkonzentrationen ein Bild, ähnlich dem der Abb. 15. Dies ist auf die geringere Enzymaktivität in diesem pH-Bereich zurückzuführen.

Der spektralphotometrische Verlauf der Oxydation der Kaffeesäure bei pH 6,8 ähnelt dem der p-Cumarsäure (Abb. 16). Die Maxima der Kaffeesäure verschwinden innerhalb der ersten 2 Stunden. Die Endkurve der Oxydation nach 24 Stunden gleicht in ihrem Verlauf der entsprechenden Kurve der Oxy-

dation der p-Cumarsäure.

Messungen bei pH 6,0 führten zu gleichen Ergebnissen wie bei der p-Cumarsäure-Oxydation. Erst bei sehr geringen Substratkonzentrationen ($< 2 \times 10^{-4}$ M) erhielt man ein ähnliches Kurvenbild wie in Abb. 16.

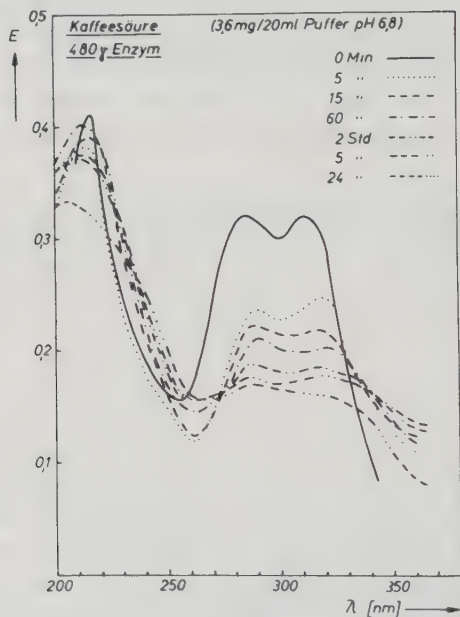


Abb. 16. Oxydation der Kaffeesäure bei pH 6,8

b. im langwelligen Bereich

Eine parallel dazu verlaufende Untersuchung der Oxydation im langwelligen Bereich verlief ergebnislos. Obgleich die Lösungen durch die Chinonbildung stark verfärbt waren, zeigten sie nur eine uncharakteristische Absorption ohne definierte Maxima.

2. Manometrische Messungen

Die Messungen des Sauerstoffverbrauchs erfolgten wieder in der Warburgapparatur. Verschiedene Substratkonzentrationen (9×10^{-3} / 9×10^{-4} und 9×10^{-5} M) wurden mit der gleichen Enzymkonzentration pro ml Reaktionsansatz wie bei den analogen Messungen des vorhergehenden Systems oxydiert. Die Ergebnis-

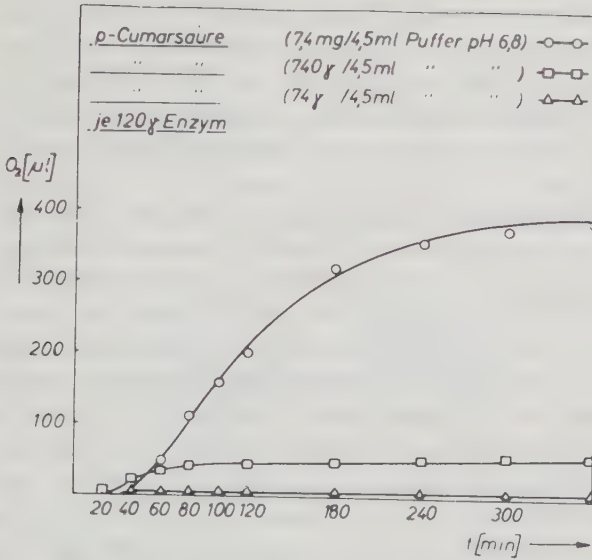


Abb. 17. Oxydation der p-Cumarsäure bei pH 6,8

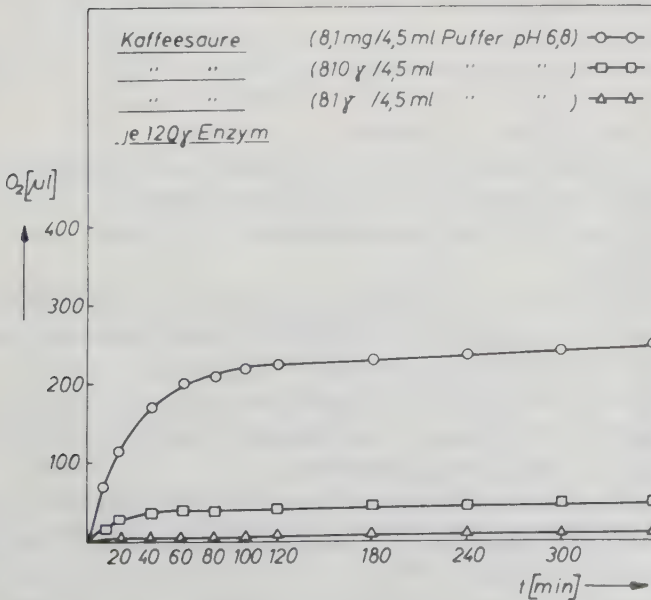


Abb. 18. Oxydation der Kaffeesäure bei pH 6,8

se der Oxydation bei pH 6,8 zeigen Abb. 17 und 18. Für das Monophenol ist wieder die Induktionsperiode charakteristisch, die mit den hier benutzten Enzymkonzentrationen etwa 40 Minuten beträgt, während bei der Kaffeesäure die Oxydation sofort beginnt, aber durch die Inaktivierung des Enzyms (37,38) bereits zu einem früheren Zeitpunkt beendet ist.

Vergleichende Messungen bei pH 6,0 zeigten deutlich die Abhängigkeit der Oxydation vom pH-Wert, besonders bei der p-Cumarsäure, wo es mit der verwendeten Enzymkonzentration nur zu einem äußerst geringen Sauerstoffverbrauch kommt. Es erhob sich die Frage, ob im Zuge der Sekundärreaktionen der Oxydationsprodukte unter Decarboxylierung der Zimtsäureseitenkette eine CO_2 -Entwicklung stattfand. Eine derartige Gasentwicklung ist von verschiedenen Autoren (48,49,50) bei der enzymatischen Oxydation des Pyrogallols und der Gallussäure beobachtet worden, wobei die Benzotropolonderivate Purpurogallin und Purpurogallincarbonsäure unter Ausscheidung von CO_2 gebildet werden. HERRMANN (51) veröffentlichte 1954 eine Arbeit, in der er eine ganze Reihe mono- und diphenolischer Derivate auf eine CO_2 -Entwicklung während der enzymatischen Oxydation untersuchte. Eine derartige, wenn auch schwache Reaktion glaubte er auch bei der Kaffeesäure feststellen zu können.

Die Untersuchung wurde in mit einem Einsatz versehenen Warburggefäßen durchgeführt. In den Einsatz wurden 0,1 ml Natronlauge und ein Filterpapierschnitzel zur Absorption des CO_2 gebracht.

Bei der Oxydation von Lösungen verschiedener Substratkonzentration mit niedrigen und erhöhten Enzymkonzentrationen konnten wir keine CO_2 -Entwicklung beobachten.

Im Hinblick auf das Ergebnis HERRMANN'S (51) sollte man darauf hinweisen, daß Enzyme verschiedener Quellen eventuell eine Artspezifität aufweisen können.

Wie im vorhergehenden System sollte noch der Einfluß geringer Mengen des Diphenols auf die enzymatische Oxydation des Monophenols untersucht werden, also eine Nachahmung des Zustands einige Zeit nach Beginn der Oxydation der p-Cumarsäure.

Während in Abb. 19 die 9×10^{-5} M Kaffeesäurelösung einen kaum meßbaren Sauerstoffverbrauch zeigt, beginnt die Oxydation der 9×10^{-3} M p-Cumarsäurelösung allein nach etwa 50 Minuten. Das Gemisch beider Substanzen wird aber sofort oxydiert, wobei es wieder zu einem wesentlich höheren Sauerstoffverbrauch kommt. Diese Wirkung kann, da o-Chinone monophenolische Substanzen nicht oxydieren können, nicht auf das aus den Spuren Kaffeesäure gebildete Chinon zurückzuführen sein.

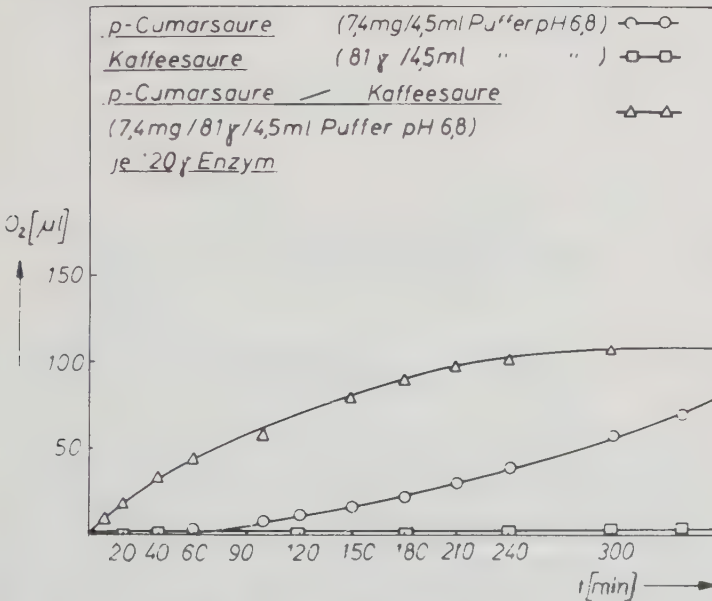


Abb. 19. Oxydation der p-Cumarsäure bei pH 6,8 in Gegenwart von Spuren Kaffeesäure

Ein weiterer Versuch ließ die geringe Menge Kaffeesäure wieder aus einer zweiten Ansatzbirne des Warburggefäßes erst nach 55 Minuten zufließen, also nach Beendigung der Induktionsperiode. Abb. 20 zeigt das plötzliche Ansteigen des Sauerstoffverbrauchs, wahrscheinlich hervorgerufen durch die plötzliche Erhöhung des Substrats Kaffeesäure.

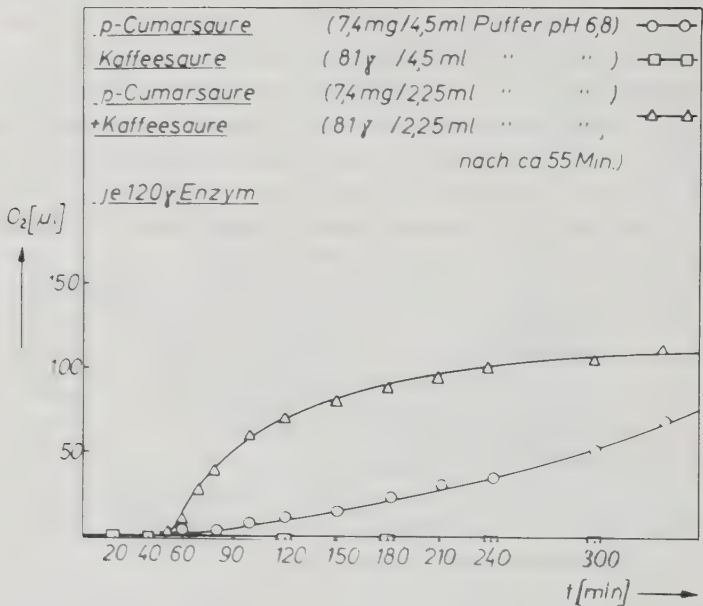


Abb. 20. Oxydation der p-Cumarsäure bei pH 6,8 bei Zugabe der Spuren Kaffeesäure nach 55 Minuten Reaktionszeit

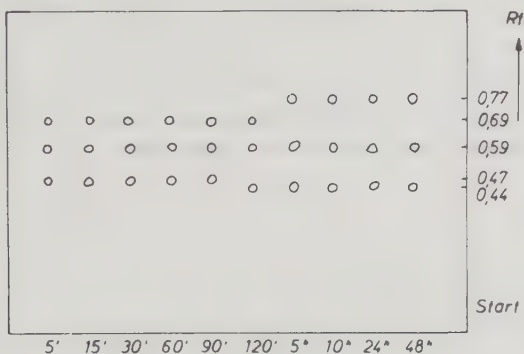
3. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

In der Literatur werden als Adsorbens für die Trennung Kieselgel und als ideale Laufmittel phenolischer Carbonsäuren Benzol/Dioxan/Eisessig (90 : 25 : 4) und Benzol/Methanol:Eisessig (45 : 8 : 4) angeführt (52). Reproduzierende Versuche ergaben auch gut abgegrenzte R_f -Werte, nur färbten sich beim Auftragen der Substanzen auf Kieselgel diese ebenfalls schon dunkel und beim spektrophotometrischen Messen einer auf Kieselgel gelaufenen und dann mit Methanol eluierten p-Cumarsäure- und Kaffeesäureprobe zeigte die Kurve einen ähnlichen Verlauf, wie wir ihn bei der beginnenden enzymatischen Oxydation erhielten (s. Abb. 15 und 16). Aus diesem Grunde wurde als Adsorbens Zellulose gewählt, die keinen oxydativen Einfluß auf die Substanzen hatte. Als Laufmittel wurde 15% Essigsäure herangezogen; hiermit kann-

ten relativ günstige Trennungen erhalten werden.

a. Oxydation der Kaffeesäure

Abb. 21 zeigt das Rf-Diagramm, das bei der Oxydation einer Kaffeesäurelösung (72 mg/40 ml Puffer) bei pH 6,8 erhalten wurde.



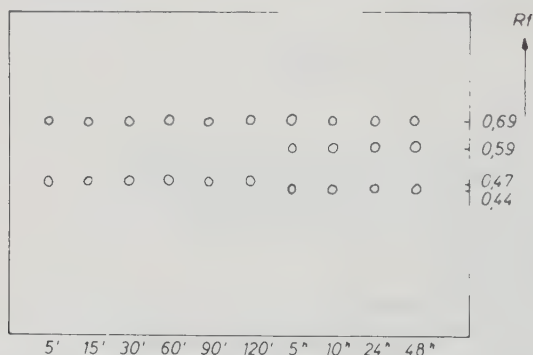
Kaffeesäure (72mg/40ml Puffer, pH 6,8)
 +900 γ Enzym, nach 90Min weitere Zugabe von
 9,0mg Enzym
Rf 0,69 und 0,47: Kaffeesäure
Rf 0,44/0,59 und 0,77 Oxydationsprodukte

Abb. 21. Oxydation einer Kaffeesäurelösung bei pH 6,8

Die Kaffeesäure bildet bei der Entwicklung als isomere Verbindung 2 Flecke (Rf 0,69 und 0,47). Sie fluoreszieren im UV-Licht hellviolett und färben sich mit diazotierter Benzidinlösung (41) dunkelbraun. Unmittelbar nach Beginn der enzymatischen Oxydation entsteht ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,59, der bis zum Schluß der Reaktion zu erkennen ist. Nach Zugabe einer zehnfachen Enzymmenge nach 90 Minuten verschwinden nach etwa 2 Stunden die Flecke der Kaffeesäure, und es bilden sich stattdessen 2 neue Flecken mit den Rf-Werten 0,77 und 0,44 aus, die gleichfalls bis zum Ende der Reaktion sichtbar bleiben. Auch sie leuchten unter der UV-Lampe hellviolett, färben sich aber mit diazotierter Benzidinlösung (41) nur noch schwach hellbraun.

Die Ergebnisse konnten bestätigt werden, indem eine Kaffeesäurelösung geringerer Konzentration (7,2 mg/40 ml Puffer) zum Vergleich bei pH 6,8 in gleicher Weise oxydiert wurde.

Die geringe Enzymmenge reichte hier aber schon aus, um bereits vor der Zugabe der zehnfachen Enzymmenge die Flecke der Kaffeesäure verschwinden und die Oxydationsprodukte mit den Rf-Werten 0,77 und 0,44 entstehen zu lassen. Vergleicht man dazu die Oxydation bei pH 6,0, so ist bei entsprechenden Reaktionsbedingungen die Reaktionslösung weniger dunkel gefärbt und die Menge des bereits während der Oxydation ausfallenden polymeren Niederschlags erheblich geringer als bei pH 6,8. Das ebenso entwickelte Rf-Diagramm unterscheidet sich von dem des anderen pH-Bereichs deutlich (Abb. 22).



Kaffeesäure (72mg/40ml Puffer pH 6,0)
 + 900 γ Enzym, nach 90 Min weitere Zugabe von
 9,0mg Enzym
 Rf 0,69 und 0,47 Kaffeesäure
 Rf 0,59 und 0,44 Oxydationsprodukte

Abb. 22. Oxydation einer Kaffeesäurelösung bei pH 6,0

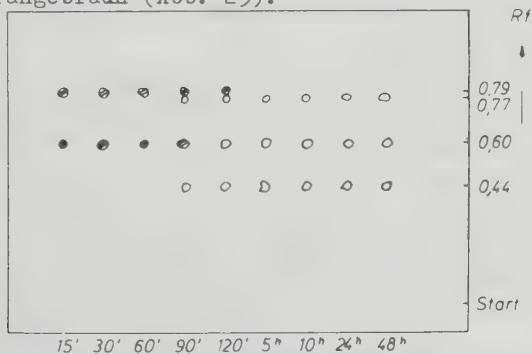
Das eine Kaffeesäure-Isomere (Rf 0,69) ist bis zum Schluß, im UV-Licht hellviolett leuchtend, sichtbar, während die Flecken mit den Rf-Werten 0,59 und 0,44 erst nach 5 Stunden auftreten. Das Oxydationsprodukt mit dem Rf-Wert 0,77 ist dagegen nirgends zu erkennen. Sämtliche Zwischenprodukte fluoreszieren im UV-Licht hellviolett und färben sich mit diazotierter Benzidinlösung (41) schwach hellbraun. Diese unterschiedlichen Chromatogrammbilder dürften ebenfalls auf die geringere Enzymaktivität und die geringere Autoxydation bei pH 6,0 zurückzuführen sein.

Diese Ergebnisse lassen auch die unterschiedlichen Angaben

in der Literatur verständlich erscheinen. MIKHAILOV (53,54) gibt an, daß er nach der Einwirkung einer Phenoloxydase aus Tabak 4 blau fluoreszierende Flecken erhält. HERRMANN (30) beschreibt nach Einwirkung einer Oxydase aus Champignons das Auftreten eines blau fluoreszierenden Oxydationsprodukts. TANNER und RENTSCHLER (55) dagegen, die einen Enzymextrakt aus *Botrytis cinerea* benutzten, erhielten 3 Flecke, von denen der eine gelb gefärbt war und im UV-Licht rötlichviolett erschien. Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese Ergebnisse auch noch auf ein unterschiedliches Verhalten von Enzymen verschiedener Quellen zurückzuführen sind.

b. Oxydation der p-Cumarsäure

Bei der unter gleichen Bedingungen erfolgenden Oxydation der p-Cumarsäure bei pH 6,8 zeigte das Chromatogramm zwei Flecke, die den Isomeren der p-Cumarsäure zuzuordnen waren (R_f 0,79 und 0,60). Sie fluoreszierten im UV-Licht dunkelviolett und färbten sich mit diazotierter Benzidinlösung (41) orangebraun (Abb. 23).



p-Cumarsäure (65,6mg/40ml Puffer pH 6,8)

+900 μ Enzym, nach 90 Min weitere Zugabe von

9,0mg Enzym

R_f 0,79 und 0,60 p-Cumarsäure

R_f 0,77/0,44 und 0,60 (nach 90 Min) Oxydationsprodukte

Abb. 23. Oxydation einer p-Cumarsäurelösung bei pH 6,8

Bis zur Zugabe der zehnfachen Enzymmenge blieb das Chromatogramm unverändert. Dann entstanden ein hellviolett fluoreszierender Fleck R_f 0,44 und ein ebenso leuchtender

Fleck mit dem Rf-Wert 0,77. Der einem p-Cumarsäure-Isomeren entsprechende Fleck Rf 0,60 war nach 90 Minuten im UV-Licht hellviolett gefärbt wie der entsprechende Fleck Rf 0,59 der Kaffeesäure, färbte sich aber beim Ansprühen noch orangebraun, während die anderen Zwischenprodukte (Rf 0,77 und 0,44) bereits hellbraun angefärbt wurden. Erst nach 2 Stunden ging die Färbung des Flecks Rf 0,60 bei weiterer hellvioletter Fluoreszenz ebenfalls in braun über. Zu gleicher Zeit verschwand der Fleck des zweiten p-Cumarsäure-Isomeren Rf 0,79.

Auch hier wurde die Untersuchung bei einer weniger konzentrierten Substratlösung wiederholt. Das Ergebnis bestätigte die entsprechende Messung bei der Kaffeesäure: bereits nach 60 Minuten bildeten sich ohne Zusatz größerer Enzymmengen die Zwischenprodukte Rf 0,44 und 0,77. Das p-Cumarsäure-Isomere Rf 0,60 fluoresziert bereits nach 15 Minuten unter der UV-Lampe hellviolett, färbt sich aber noch orangebraun an, und erst nach der Zugabe der zehnfachen Enzymmenge ist es, wie alle Zwischenprodukte der Kaffee- und p-Cumarsäureoxydation, braun gefärbt.

Der pH-Bereich 6,0 führte wegen der geringeren Enzymaktivität wie bei der Kaffeesäure auch hier zu deutlichen Unterschieden. Die Induktionsperiode dauerte bis zur Zugabe der erhöhten Enzymmenge, erst dann kam es zur braunen Verfärbung des Reaktionsansatzes. Die hellviolett fluoreszierenden Flecke (Rf 0,77 und 0,44) bildeten sich erst nach 5 Stunden und die beiden p-Cumarsäure-Isomeren Rf 0,79 und 0,60 fluoreszierten bis zum Ende der Oxydation im UV-Licht dunkelviolett und färbten sich nach dieser Zeit beim Besprühen mit diazotierter Benzidinlösung (41) sogar noch orangebraun. Erst nach einer erneuten Enzymzugabe von 5 mg fluoreszierte der Fleck Rf 0,60 unter der UV-Lampe hellviolett und färbte sich beim Besprühen braun an.

Trotz gewisser Schwankungen deuten die gleichen Rf-Werte, die gleichen Färbungen beim Besprühen und die hellviolette Fluoreszenz darauf hin, daß die Zwischenprodukte der p-Cumarsäureoxydation identisch mit denen der Kaffeesäureoxydation sind.

Es sei erwähnt, daß bei der Oxydation bei pH 5,2 die im Sy-

stem Phenol/Brenzkatechin gemachten Beobachtungen bestätigt wurden: Wegen des Überschreitens des pH-Optimums der Enzymwirkung wurden die Substrate bzw. die enzymatisch gebildeten Folgeprodukte wesentlich schwächer oxydiert. Die Oxydation ist in diesem pH-Bereich so gering, daß die Chromatogramme auch nach 48 Stunden unverändert sind. Allein bei der Kaffeesäure entsteht der Fleck Rf 0,59 und das entsprechende p-Cumarsäure-Isomere Rf 0,60 fluoresziert erst nach 48 Stunden unter der UV-Lampe ganz schwach hellviolett, wobei es sich beim Besprühen unverändert orangebraun anfärbt.

c. Oxydation einer Mischung von p-Cumarsäure und wenig Kaffeesäure

Bei der Oxydation eines Gemischs einer p-Cumarsäure- und Kaffeesäurelösung (65,6 mg p-Cumarsäure und 720 γ Kaffeesäure in 40 ml Puffer) bei pH 6,8 wurden hinsichtlich der Oxydationsprodukte keine wesentlichen Unterschiede gegenüber der Oxydation der beiden Säuren allein festgestellt. Damit scheint, zumindest chromatographisch, der Beweis vorzuliegen, daß gleiche Zwischenprodukte bei der Oxydation der beiden Zimtsäurederivate entstehen.

d. Spektralphotometrische Untersuchung der Rf-Werte

Wir versuchten auch hier, einige der erhaltenen Oxydationsprodukte spektralphotometrisch zu bestimmen. Da sich nach zehnstündiger Oxydation besonders klare Flecken gebildet hatten, wurden sie nach dem Entwickeln des Chromatogramms mit Methanol eluiert.

Die Ergebnisse waren unbefriedigend. Wir erhielten zwar bisweilen gleiche, teilweise aber recht uncharakteristische Spektren, andererseits zeigte ein Teil der Kurven keine Übereinstimmungen. Neben der in der Methode liegenden Ungenauigkeit dürfte dies auf die große Instabilität dieser phenolischen Oxydationsprodukte zurückzuführen sein.

e. Bildung von Kaffeesäure im System Enzym/p-Cumarsäure/Ascorbinsäure

Es war uns bisher nur gelungen, den Rf-Werten, der Fluores-

zenz und bisweilen gewisser Übereinstimmungen der Spektren nach gleiche Oxydationsprodukte bei der enzymatischen Oxydation der p-Cumar- und der Kaffeesäure festzustellen. Es tauchte nun die Frage auf, ob es nicht möglich wäre, mit Hilfe der in der Literatur lange bekannten Reaktion zwischen o-Chinonen und der Ascorbinsäure die Kaffeesäure, die in dem System Enzym/p-Cumarsäure/Ascorbinsäure anfällt, spektral-photometrisch nachzuweisen. KASTNER (56) war es bereits 1959 gelungen, bei der enzymatischen Oxydation von Umbelliferon (7-Hydroxycumarin) in Gegenwart von Ascorbinsäure die Bildung von Aesculetin (6,7-Dihydroxycumarin) papierchromatographisch anzuzeigen.

Der Reaktionsansatz enthielt im Verhältnis zu der in Phosphatpuffer pH 6,8 gelösten p-Cumarsäure etwa die dreifache Menge Enzym und Ascorbinsäure. Nach dem Einleiten von Luft in das Reaktionsgefäß wurde nach etwa 3 Minuten eine Probe entnommen und diese chromatographiert. Deutlich waren unter der UV-Lampe die hellviolett fluoreszierenden Kaffeesäure-Isomere (R_f 0,69 und 0,47) zu erkennen, die sich mit diazotierter Benzidinlösung (41) auch charakteristisch braun anfärbten. Bei der spektralphotometrischen Untersuchung dieser Flecken war dennoch keine Kurve zu erkennen, die annähernd der des Kaffeesäurespektrums glich. Auch Wiederholungen des Ansatzes, bei denen die Proben bereits nach 1 und 2 Minuten entnommen worden waren, brachten negative Ergebnisse: die erhaltenen Spektren waren so uncharakteristisch wie die der Oxydationsprodukte der p-Cumar- bzw. der Kaffeesäure. Erst als in einem erneuten Versuch unmittelbar nach dem Einleiten des Luftstroms eine Probe entnommen und diese nach entsprechender Vorbehandlung spektralphotometrisch untersucht wurde, erhielten wir das in Abb.24 auf der folgenden Seite dargestellte Ergebnis. Das Spektrum gleicht völlig der Kurve, die man nach etwa zehnminütiger enzymatischer Oxydation der Kaffeesäure allein erhält. Beide Kurven sind identisch mit der des Kaffeesäurechinons, gemessen in Methanol. Mit dem Verlauf dieser Untersuchung dürfte zweifellos der Beweis gelungen sein, daß man enzymatisch aus p-Cumarsäure Kaffeesäure herstellen kann. Eine spektralphotometrisch mit der Kaffeesäure identische Kurve zu erhalten, war unmöglich.

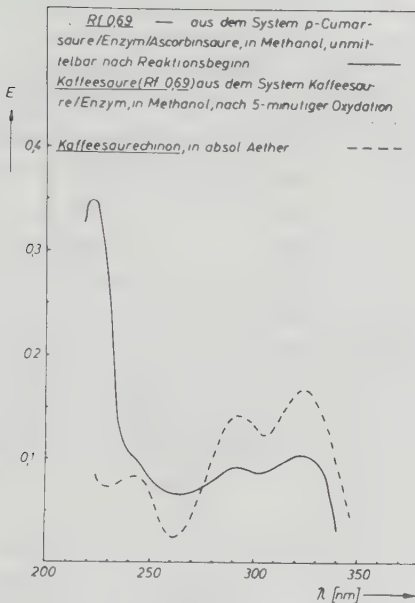


Abb. 24. Spektren des Rf-Werts 0,69, gebildet im System Enzym/p-Cumarsäure/Ascorbinsäure

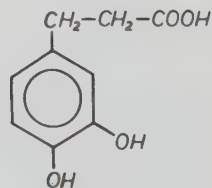
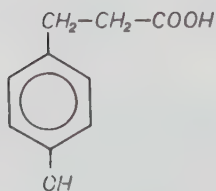
Ebenso scheint das Auftreten von Flecken der Kaffeinsäure mit der typischen hellvioletten Fluoreszenz im UV-Licht und der charakteristischen Bräunung beim Besprühen mit diazotierter Benzidinlösung (41) nicht gleichbedeutend mit dem Vorhandensein reiner Kaffeinsäure zu sein. Trotz gewisser Übereinstimmungen ist sie bereits weiter oxydiert oder noch nicht vollständig reduziert.

Dieses Ergebnis läßt sich mit Berichten anderer Arbeitskreise (31,32) vergleichen. So gelang es MASON und PETERSON (31) nicht, ein enzymatisch gebildetes 5,6-Indolchinon mit Ascorbinsäure zum 5,6-Dihydroxyindol zu reduzieren und OKU (32) berichtet ähnliches von dem vergeblichen Versuch der Reduktion des o-Benzochinons zum Brenzkatechin. Es wird vermutet, daß diese Reduktion begleitet ist von der Bildung reaktiver Semichinone, die zu Leukodimeren zusammentreten (28, 29).

4. Versuch der Bildung von Additionsprodukten

Entsprechend wie beim Phenol und Brenzkatechin sollte versucht werden, die als Oxydationsprodukte auftretenden o-Chinone durch Umsetzung mit Anilin zu binden. Nach dem Einleiten von Luft in die Reaktionsansätze, die wieder zur raschen Oxydation und Addition viel Enzym und Anilin enthielten, fiel aber in diesem System - bei der Kaffeesäure sofort, bei der p-Cumarsäure etwas später - ein schwarzgrüner, schlammiger Niederschlag aus, der sich nicht weiter reinigen ließ. Auch der Versuch, die p-Cumarsäure und Kaffeesäure in Gegenwart von Phenylhydrazin unter Bildung eines Diphenylhydrazons des Kaffeesäurechinons zu oxydieren (36), mißlang. Die Niederschläge, die sich bei der enzymatischen Oxydation der beiden Säuren allein bildeten, enthielten dagegen wie im anderen System die gleichen Aminosäuren wie das hydrolysierte Enzym selbst.

Das Mißlingen der Reaktion zwischen den Chinonen und dem Anilin ließ uns zunächst vermuten, daß dies eventuell auf die aktive, ungesättigte Seitenkette der Substrate zurückzuführen sei. Um hierauf einen Hinweis zu erhalten, zogen wir abschließend noch zum Vergleich das System 4-Hydroxyphenylpropionsäure/3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure heran.



Ogleich sich bei der Reaktion zwischen diesen beiden Substraten, dem Enzym und dem Anilin die Lösungen wie im System Phenol/Brenzkatechin rotviolett verfärbten, fiel auch hier

kein kristalliner Niederschlag aus.

Die Untersuchungen des Systems p-Cumarsäure/Kaffeesäure bestätigten aber ebenfalls unsere Theorie, daß bei C-4-substituierten Phenolen keine Phenolätherbildung wie im System Phenol/Brenzkatechin auftritt.

C. Zusammenfassung und Diskussion

=====

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die enzymatische Oxydation eines Monophenols und seines entsprechenden Diphenols einen gleichen Verlauf nimmt, wie es in der Literatur durchweg beschrieben wird (z.B. 4). Es waren im wesentlichen 3 Gründe, die uns zu der Beschäftigung mit diesem Problem führten:

- 1) die Tatsache, daß es bis heute in der Literatur nur wenig Angaben darüber gibt, ob bei der enzymatischen Oxydation eines Monophenols die gleichen Produkte wie bei der des entsprechenden Diphenols auftreten.
- 2) die teilweise widersprüchlichen Angaben (30,53,54,55) über die Art und Zahl entstandener Oxydationsprodukte.
- 3) die in unserem Arbeitskreis bei der enzymatischen Oxydation des Morphins in Gegenwart von p-Cumarsäure bzw. Kaffeesäure als Überträger gemachten Beobachtungen, daß im System Enzym/p-Cumarsäure/Morphin Pseudomorphin als Oxydationsprodukt entsteht, während dies im System Enzym/Kaffeesäure/Morphin nicht der Fall ist.

Wir verwendeten zur Untersuchung als Substrate die Systeme Phenol/Brenzkatechin und 4-Hydroxycimtsäure/3,4-Dihydroxycimtsäure (p-Cumarsäure/Kaffeesäure) und als Enzym eine Tyrosinase aus Champignons.

Bei der enzymatischen Oxydation des Phenols bzw. des Brenzkatechins konnten wir unterschiedliche Reaktionen beobachten. So erhielten wir bei der Brenzkatechinoxidation 4 Flecke, von denen sich 3 beim Besprühen mit diazotierter Benzindilösung (41) braun färbten, während beim Phenol außer dem enzymatisch gebildeten Brenzkatechin keines dieser 4 Produkte zu erkennen war. Dafür trat bei pH 5,2 ein neues Produkt auf, das sich bereits beim Besprühen durch seine Gelbfärbung von den anderen Flecken abhob und bei der enzymatischen Oxydation des Brenzkatechins nicht nachweisbar war. In Anlehnung an die Arbeiten WAGREICHs und NELSONs (23) und DAWSONs und TARPLEYs (24), die bei der enzymatischen Oxydation des Brenzkatechins die intermediäre Bildung eines 1,2,4-Trihydroxybenzols durch Wasseranlagerung an das o-Benzochinon beobach-

derivat des Brenzkatechins bzw. des o-Benzochinons handeln könnte, entstanden durch eine Reaktion zwischen dem enzymatisch gebildeten o-Benzochinon und restlichem Phenol. Durch Umsetzungen von nichtenzymatisch gebildetem o-Benzochinon und Phenol und durch eine Synthese des 4-Phenoxybrenzkatechins konnten wir unsere Theorie erhärten. Es handelt sich hierbei um ein sehr instabiles Produkt, dessen Bildung bei der Oxydation bei pH 6,0 nur bei Zusatz von Ascorbinsäure sichtbar gemacht werden kann. Wir konnten beweisen, daß die Bildung eines solchen 4-Phenoxyäthers bei der Oxydation des Phenols nur möglich ist, wenn die C-4-Stellung unbesetzt ist. So erhielten wir bei vergleichenden Untersuchungen im System p-Kresol/4-Methylbrenzkatechin und in dem zweiten unserer untersuchten Systeme, p-Cumarsäure/Kaffeesäure, bei denen Substitution am C-4-Atom vorliegt, identische Flecken. Ebenso wurde das Produkt nicht gebildet, wenn wir eine 4-Methylbrenzkatechinlösung mit einem Zusatz geringer Spuren Phenol oxydierten, oder bei der Oxydation von Brenzkatechin-, 3-Methylbrenzkatechin- bzw. 4-Methylbrenzkatechinlösungen unter Zusatz geringer Spuren Anisol. Die Tatsache, daß wir trotz der oben erwähnten Unterschiede bei der Umsetzung von aus Phenol bzw. Brenzkatechin gebildetem o-Benzochinon und Anilin identische Additionsprodukte eines Dianilinobenzochinons erhielten, braucht in keinem Widerspruch zu den obigen Ergebnissen zu stehen. Die Konzentrationen an Anilin und Enzym sind ja so groß gewählt, daß das gebildete o-Benzochinon sofort mit dem Anilin reagiert, bevor Reaktion mit noch nicht umgesetztem Phenol eingetreten ist.

Die Bildung eines solchen Additionsprodukts mißlang im System p-Cumarsäure/Kaffeesäure. Vermutungen, daß hierbei die ungesättigte Seitenkette der Zimtsäurederivate eine Rolle spiele, konnten nicht bestätigt werden.

Wir konnten aber auch hier beweisen, daß bei der Oxydation der p-Cumarsäure im ersten Reaktionsschritt Kaffeesäure gebildet wird. Der exakte Nachweis dieser Verbindung auf spektralphotometrischem Wege gelingt aber wegen der Gefahr einer weiteren Oxydation der Kaffeesäure nur in Gegenwart von Ascorbinsäure. Wir konnten hierbei die Beobachtungen anderer

zymatisch gebildetes o-Benzochinon mit Ascorbinsäure zum Diphenol zu reduzieren. Eine annähernde Kurve der Kaffeesäure wurde nur erhalten, wenn sofort nach Beginn der Oxydation eine Probe dem System Enzym/p-Cumarsäure/Ascorbinsäure entnommen wurde. Schon nach einminütiger Oxydation ist das Spektrum trotz äußerer Übereinstimmungen (Lage des Rf-Werts, Fluoreszenz und Färbung beim Besprühen) völlig uncharakteristisch. Es wäre hier die von anderen Arbeitskreisen (28, 29) diskutierte Möglichkeit zu erwähnen, daß die Reduktion der Chinone nicht quantitativ zum Diphenol führt, sondern daß, ausgehend von reaktiven Semichinonen, Sekundärreaktionen eintreten.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen:

Die enzymatische Oxydation eines Monophenols mit Tyrosinase führt im ersten Reaktionsschritt zum entsprechenden Diphenol, das weiter zum o-Chinon oxydiert wird, wie wir in dem System Enzym/Phenol durch die Bildung eines kristallinen Dianilinobenzochinons und in dem System Enzym/p-Cumarsäure durch das Auftreten eines annähernden Kaffeesäurespektrums in Gegenwart von Ascorbinsäure beweisen konnten. Ob in geringerem Maße noch Nebenreaktionen auftreten, wurde nicht weiter untersucht. Die Folgereaktionen brauchen jedoch bei der enzymatischen Oxydation entsprechender Mono- und Diphenole nicht parallel zu laufen, da bei der Oxydation von Monophenolen das Enzym nach kurzer Zeit auf ein Gemisch von Monophenol und Diphenol einwirkt.

D. Experimenteller Teil

I. Champignon-Tyrosinase (-Phenoloxydase)

Es wurde eine "Tyrosinase from Mushrooms" der Sigma Chemical Company St.Louis, Missouri, USA, benutzt. Die zu den jeweiligen Versuchen gewünschten Konzentrationen wurden durch Lösen des Enzyms in bidestilliertem Wasser hergestellt. Die Angabe der Enzymaktivität erfolgte nach dem Messen des Sauerstoffverbrauchs in der Warburgapparatur in Cresolase-Einheiten (Aktivität gegenüber Monophenolen), gemessen mit p-Kresol als Substrat, und in Catecholase-Einheiten (Aktivität gegenüber Diphenolen), gemessen mit Brenzkatechin als Substrat. Zur Messung gegenüber p-Kresol diente folgender Ansatz:

2 ml p-Kresollösung in M/75-Phosphatpuffer nach MICHAELIS (57)^x pH 6,0 (= 9 mg p-Kresol)

2 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0

1 ml Enzymlösung 1 : 160 (Die Stammlösung enthielt 55 mg Enzym/10 ml. 1 ml dieser Stammlösung wurde mit 159 ml bidestilliertem Wasser verdünnt. Somit enthielt 1 ml dieser verdünnten Lösung 34,4 γ Enzym)

Zur Messung gegenüber Brenzkatechin diente folgender Ansatz:

2 ml Brenzkatechinlösung in M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 (= 8 mg Brenzkatechin)

2 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0

1 ml Enzymlösung 1 : 300 (1 ml der Stammlösung wurde mit 299 ml bidestilliertem Wasser verdünnt. Somit enthielt 1 ml dieser verdünnten Lösung 18,3 γ Enzym)

Nach GRAUBARD und NELSON (58,59) hat die Enzymmenge 1 Cresolase-Einheit, die unter optimalen Bedingungen, d.h. bei optimalem pH (6-7) und optimaler Substratkonzentration (bei Verwendung von p-Kresol 1,8 mg/ml Reaktionsansatz) eine Sauerstoffaufnahme von 10 μ l pro Minute bewirkt. 1 Catecholase-Einheit verursacht die gleiche Sauerstoffaufnahme gegenüber

^x) für sämtliche Messungen wurde Phosphatpuffer nach MICHAELIS (57) benutzt.

optimalen Brenzkatechinmengen (1,6 mg/ml Reaktionsansatz). Wegen der starken Enzyminaktivierung bei der Oxydation des Brenzkatechins wurden bei der Catecholase-Aktivitätsbestimmung nur die in der 2. und 3. Minute nach Reaktionsbeginn gemessenen Sauerstoffmengen bewertet.

1 mg Enzym entsprach, unmittelbar nach der Herstellung der Stammlösung, 6,97 Cresolase-Einheiten (Cr.E.) bzw. 19,1 Catecholase-Einheiten. 1 ml der Stammlösung, also 5,5 mg Enzym, entsprach 38,3 Cresolase-Einheiten bzw. 105 Catecholase-Einheiten.

II. Spektralphotometrische Messungen

Die Messungen wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bei 25° vorgenommen. Hierbei wurden für die Messungen im UV-Bereich Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke, für die Messungen im sichtbaren Bereich solche von 2 cm Schichtdicke benutzt. Das Lösungsmittel für die Substrate war M/75-Phosphatpuffer pH 6,8/6,0 und 5,2.

a. Im kurzwelligen Bereich

Die Ansätze enthielten
im System Phenol/Brenzkatechin:

940 γ Phenol, gelöst in
20 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2
2,2 mg Brenzkatechin, gelöst in
20 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2
1 ml Enzymlösung mit je 500 γ Enzym

im System p-Cumarsäure/Kaffeensäure:

3,28 mg p-Cumarsäure bzw. 3,6 mg Kaffeensäure, gelöst in
20 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 bzw. 6,0
1 ml Enzymlösung mit je 480 γ Enzym

Mittels einer Aquariumpumpe wurde ein kräftiger Luftstrom in die Gefäße geleitet und jeweils nach 5 (nur beim Diphenol), 15, 60, 120 Minuten und nach 5 und 24 Stunden 1 ml der Lösung entnommen und mit 0,1 ml N-Salzsäure inhibiert. Je 0,1 ml dieser Lösung (bei der Untersuchung des Phenols 0,5 ml) wurde mit bidestilliertem Wasser auf 2,5 ml aufgefüllt

und gegen eine Vergleichslösung, die alle Substanzen außer den Substraten enthielt, gemessen.

b. im langwelligen Bereich

Die Ansätze enthielten

im System Phenol/Brenzkatechin:

2,82 mg Phenol bzw. 3,3 mg Brenzkatechin, gelöst in
30 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2

im System p-Cumarsäure/Kaffeensäure:

4,92 mg p-Cumarsäure bzw. 5,4 mg Kaffeensäure, gelöst in
30 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 bzw. 6,0

Nach Zugabe von je 1 ml Enzymlösung mit 600 γ Enzym wurde durch eine Aquariumpumpe Luft in die Gefäße geleitet. Nach 60-90 Minuten wurde zur quantitativen Oxydation die fünffache Enzymmenge, also je 3 mg, in 1 ml bidestilliertem Wasser zugesetzt. Den Reaktionsansätzen wurden erstmalig nach 5 bzw. 15 Minuten, später in etwa halbstündigen Abständen, 1 ml entnommen, diese mit 0,1 ml N-Salzsäure inhibiert, mit bidestilliertem Wasser auf 2,5 ml aufgefüllt und gegen eine Vergleichslösung, die keine Substrate enthielt, gemessen.

III. Manometrische Messungen

Die Aktivitätsmessungen der Champignontyrosinase und alle Messungen des Sauerstoffverbrauchs wurden in der Warburgapparatur bei 25° mit 5 ml Reaktionslösung durchgeführt, mit Ausnahme der Untersuchungen auf eine Kohlendioxidentwicklung, bei denen nur ein 2,5 ml-Reaktionsansatz verwendet wurde; hier enthielten die Gefäße in einem Einsatz 0,1 ml Natronlauge. Die Enzymlösung befand sich in den seitlichen Ansatzbirnen, aus denen sie erst nach einem etwa viertelstündigen Temperatúrausgleich zur Substratlösung gegeben wurde. Das Lösungsmittel war bei allen Warburgmessungen M/75-Phosphatpuffer. Zur Berücksichtigung der Autoxydation und von Luftdruckschwankungen liefen jeweils 2 Gefäße mit, die außer dem Enzym alle Substanzen enthielten. Die Gefäße wurden mit einer Frequenz von 120 Schwingungen/Minute geschüttelt.

a. Ansätze Enzym/Monophenol und Enzym/Diphenol

System Phenol/Brenzkatechin:

- 1) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2 mit
4,23 mg Phenol bzw.
4,95 mg Brenzkatechin
- 2) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2 mit
423 γ Phenol bzw.
495 γ Brenzkatechin
- 3) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2 mit
42,3 γ Phenol bzw.
49,5 γ Brenzkatechin

System p-Cumarsäure/Kaffeesäure:

- 1) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 bzw. 6,0 mit
7,4 mg p-Cumarsäure bzw.
8,1 mg Kaffeesäure
- 2) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 bzw. 6,0 mit
740 γ p-Cumarsäure bzw.
810 γ Kaffeesäure
- 3) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 bzw. 6,0 mit
74 γ p-Cumarsäure bzw.
81 γ Kaffeesäure

Es wurden jeweils 0,5 ml Enzymlösung zugesetzt. Diese enthielten im System Phenol/Brenzkatechin 125 γ Enzym, im System p-Cumarsäure/Kaffeesäure 120 γ Enzym.

b. Ansätze Enzym/wenig Diphenol/Monophenol

System Phenol/Brenzkatechin:

- A) 1) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 mit
4,23 mg Phenol
- 2) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 mit
4,95 γ Brenzkatechin
- 3) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 mit
4,23 mg Phenol und
4,95 γ Brenzkatechin

Es wurden jeweils 0,5 ml Enzymlösung mit je 125 γ Enzym zugesetzt. Die Substrate befanden sich immer im Hauptraum der

Gefäße.

- B) 1) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 mit
4,23 mg Phenol
2) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 mit
4,95 γ Brenzkatechin
3) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 mit
4,23 mg Phenol und
4,95 γ Brenzkatechin in einer zweiten Ansatzbirne

Es wurden jeweils 0,5 ml Enzymlösung mit je 125 γ Enzym zugesetzt.

System p-Cumarsäure/Kaffeesäure:

- A) 1) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 mit
7,4 mg p-Cumarsäure
2) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 mit
81 γ Kaffeesäure
3) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 mit
7,4 mg p-Cumarsäure und
81 γ Kaffeesäure

Es wurden jeweils 0,5 ml Enzymlösung mit je 120 γ Enzym zugesetzt. Die Substrate befanden sich immer im Hauptraum der Gefäße.

- B) 1) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 mit
7,4 mg p-Cumarsäure
2) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 mit
81 γ Kaffeesäure
3) 4,5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 mit
7,4 mg p-Cumarsäure und
81 γ Kaffeesäure in einer zweiten Ansatzbirne

Es wurden jeweils 0,5 ml Enzymlösung mit je 120 γ Enzym zugesetzt.

IV. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden nach den bei STAHL (60) angegebenen Vorschriften durchgeführt. Als Adsorbens wurde Zellulose benutzt, als Entwickler diente 15% Essigsäure, die Laufzeit betrug etwa 30 Minuten. Zum Sichtbarmachen der Flecke wurde mit diazotierter Benzindlösung (41) besprüht.

a. Ansätze Enzym/Monophenol und Enzym/Diphenol

Zum Zwecke der Untersuchungen wurden 40 ml einer Substratlösung hergestellt. Hierzu wurden gelöst

37,6 mg Phenol bzw.

44 mg Brenzkatechin in

40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2
und

65,6 mg p-Cumarsäure bzw.

72 mg Kaffeesäure in

40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8 bzw. 6,0 bzw. 5,2

In jeden Ansatz wurden 2 ml einer Enzymlösung gegeben. Diese enthielt im System Phenol/Brenzkatechin 1 mg, im System p-Cumarsäure/Kaffeesäure 900 γ Enzym; nach 90 Minuten wurden zur quantitativen Oxydation nochmals je 2 ml mit 10 bzw. 9 mg Enzym zugesetzt.

Mittels einer Aquariumpumpe wurde ein kräftiger Luftstrom in die Gefäße geleitet. In bestimmten Zeitabständen -5 (nur bei den Diphenolen), 15, 30, 60, 90, 120 Minuten und 5, 10, 24 und 48 Stunden- wurden den Ansätzen je 1,5 ml entnommen und diese mit 0,15 ml N-Salzsäure inhibiert. Nach etwa 1 Stunde fiel beim Ansäuern ein flockiger brauner Niederschlag aus, der sich mit zunehmender Oxydation wesentlich verstärkte. Die entnommenen Mengen wurden sofort mit Essigester eluiert. Die braun verfärbten Eluate wurden über Natriumsulfat sicc. getrocknet und anschließend vorsichtig eingeengt. Die eingeengten Extrakte wurden auf einer Zelluloseplatte aufgetragen und mit 15% Essigsäure entwickelt.

b. Ansätze Enzym/wenig Diphenol/Monophenol

Hierbei wurden 40 ml einer Monophenollösung, die zusätzlich geringe Mengen des entsprechenden Diphenols gelöst enthielt, mit je 2 ml einer Enzymlösung oxydiert. Die Enzymlösung enthielt wieder im System Phenol/Brenzkatechin 1 mg, im System p-Cumarsäure/Kaffeesäure 900 γ Enzym; nach 90 Minuten wurden nochmals je 2 ml mit 10 bzw. 9 mg Enzym zugesetzt.

Die Ansätze enthielten

37,6 mg Phenol und

4,4 mg bzw. 440 γ Brenzkatechin, gelöst in

40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 5,2

und

65,6 mg p-Cumarsäure und

720 γ Kaffeesäure, gelöst in

40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8

Die weitere Verarbeitung der Ansätze erfolgte wie bei a) angegeben.

c. Oxydation des Phenols und des Brenzkatechins mit an-

 schließendem Zusatz von Ascorbinsäure

Die Ansätze enthielten

37,6 mg Phenol bzw.

44 mg Brenzkatechin, gelöst in

40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2

Die Ansätze wurden, da hier die erst nach längerer Oxydation entstehenden Produkte nachgewiesen werden sollten, sofort mit 10 mg Enzym versetzt. Mit einer Aquariumpumpe wurden die Ansätze belüftet. Die Entnahme der Proben zu je 1,5 ml erfolgte nach 1,2,3,5,10 und 24 Stunden. Nach dem Inhibieren der entnommenen Lösungen mit je 0,15 ml N-Salzsäure erfolgte ein Zusatz von jeweils 10 mg Ascorbinsäure, wobei sich die Proben etwas aufhellten, ohne allerdings ihre Färbung völlig zu verlieren. Sofort nach der Zugabe des Reduktionsmittels wurden die Proben mit Essigester eluiert, die Eluate mit Natriumsulfat sicc. getrocknet, eingengt und auf Zelluloseplatten aufgetragen.

d. Bildung von Kaffeesäure im System Enzym/p-Cumarsäure/

 Ascorbinsäure

Der Reaktionsansatz zum Nachweis der Bildung der Kaffeesäure enthielt folgende Substanzen:

- 1,5 mg p-Cumarsäure, gelöst in
- 5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8
- 5 mg Ascorbinsäure, gelöst in
- 5 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8
- 4 mg Enzym, gelöst in
- 0,5 ml bidestilliertem Wasser

Unter ständigem Schütteln des Gefäßes wurde mit einer Aquariumpumpe Luft in den Ansatz geleitet und sofort nach dem Einleiten der ersten Luftblasen eine Probe von etwa 2 ml entnommen. Diese wurde mit 0,2 ml N-Salzsäure inhibiert, mit Essigester eluiert, das Eluat über Natriumsulfat sicc. getrocknet, eingeeengt und auf einer Zelluloseplatte aufgetragen und mit 15% Essigsäure entwickelt.

e. Spektralphotometrische Untersuchung der gebildeten
Flecken

Um die Spektren der Oxydations- und Reduktionsprodukte, die in den unter IVa,b und d beschriebenen Ansätzen entstanden waren, zu untersuchen, wurden die Essigestereluat der entsprechenden Proben auf Zelluloseplatten aufgetragen, diese mit 15% Essigsäure entwickelt und die zu untersuchenden Flecke nach dem Trocknen der Platten mit der Zellulose abgeschabt und mit Methanol eluiert. Um Fehler durch mitgelöste Bestandteile der Zellulose zu vermeiden, wurde eine Vergleichslösung hergestellt, indem von einem freien Teil der Zelluloseplatte, auf der nur die Essigsäure gelaufen war, die entsprechende Menge Adsorbens abgekratzt und ebenfalls mit Methanol eluiert wurde. Beide Methanol-Zellulose-Suspensionen wurden filtriert und die jeweiligen Eluate der Flecken gegen die Vergleichslösungen in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke gemessen.

V. Untersuchung der Polymerisationsniederschläge

a.) Papierchromatographie

Die papierchromatographischen Untersuchungen der Polymerisationsniederschläge wurden nach der absteigenden Methode bei Zimmertemperatur (20°) auf Papier Whatman Nr. 1 vorge-

nommen. Es wurde mit der oberen Phase des Partridge-Gemischs [n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 5)] entwickelt. Die Flecken wurden durch Besprühen mit Ninhydrin-Lösung (61) sichtbar gemacht.

b. Herstellung der Niederschläge

Die Ansätze zur Herstellung der Niederschläge setzten sich folgendermaßen zusammen:

- 44 mg Brenzkatechin bzw.
- 37,6 mg Phenol, gelöst in
- 40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0
- und
- 72 mg Kaffeesäure bzw.
- 65,6 mg p-Cumarsäure, gelöst in
- 40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8

Jeder Ansatz wurde mit 2 ml einer Enzymlösung versetzt, die 10 mg Enzym enthielt. Nach fünfstündiger Oxydation durch Einleiten von Luft mittels einer Aquariumpumpe wurden zur Ausfällung der Niederschläge je 5 ml N-Salzsäure zugefügt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und so oft mit je 10 ml N-Salzsäurehaltigem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser frei von Aminosäuren war. Die Prüfung erfolgte durch Besprühen eines mit Waschwasser befeuchteten Filterpapiers mit Ninhydrinlösung (61). Der ausgewaschene Niederschlag, der in reinem Wasser und in hydrophilen Lösungsmitteln löslich war, wurde vorsichtig bei 50° getrocknet.

c. Hydrolyse der Niederschläge und des Enzyms

Die Hydrolyse erfolgte in Anlehnung an das Verfahren nach EASTOE (62).

Jeweils etwa 1 mg der oben gewonnenen Polymerisate wurde mit 0,1 ml 20% Salzsäure in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen 50 Stunden lang auf 105° erhitzt und die Säure danach bei Raumtemperatur im Vakuum über Phosphorpentoxid und Natriumhydroxid entfernt. Das Hydrolysat wurde in 0,5 ml Methanol gelöst und der gelblich gefärbte Extrakt papierchromatographisch untersucht. Nach dem Entwickeln und Trocknen wurde das Chromatogramm mit Ninhydrinlösung (61) besprüht

und anschließend bei 105° getrocknet.

1 mg Enzym wurde in gleicher Weise mit 0,5 ml 5% Salzsäure in einem Glasröhrchen eingeschmolzen und 25 Stunden lang bei 105° hydrolysiert. Danach wurde die Säure im Vakuum über Natriumhydroxid und Phosphorpentoxid bei Raumtemperatur entfernt, der Rückstand in 0,5 ml Methanol gelöst und der gelbe Extrakt wie oben chromatographiert. Das Chromatogramm wurde ebenso weiterbehandelt.

Die Chromatogramme aller 4 Polymerisationshydrolysate zeigten nach dem Besprühen mit Ninhydrinlösung (61) Flecken. Diese hatten entsprechende Rf-Werte und gleiche Farbtöne wie die Flecken auf dem Chromatogramm des Enzymhydrolysats. Mit Sicherheit waren im eindimensionalen Chromatogramm 7 Aminosäureflecken mit folgenden Rf-Werten zu erkennen:

0,61; 0,45; 0,37; 0,27; 0,21; 0,15; 0,07

VI. Bildung von Additionsprodukten

a. Umsetzung der o-Chinone mit Anilin

Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

200 mg Phenol bzw. Brenzkatechin

0,6 ml Anilin, gelöst in je

90 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0

und

200 mg p-Cumarsäure bzw. Kaffeesäure

0,6 ml Anilin, gelöst in je

90 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,8

Unter dauerndem Schütteln der Gefäße und dem Einleiten eines ständigen Luftstroms wurden zu dem Reaktionsansatz 80 mg Enzym, gelöst in 5 ml bidestilliertem Wasser gegeben. Während die Umsetzung in dem System p-Cumarsäure/Kaffeesäure mißlang, färbten sich in den Ansätzen des Phenols und des Brenzkatechins die Lösungen - die phenolische mit einer geringen Verzögerung - schnell rotviolett, und nach etwa 15 Minuten fiel ein kristalliner dunkelroter Niederschlag aus. Das Einleiten der Luft wurde zur vollständigen Umsetzung 3 Stunden lang fortgesetzt. Die kristallinen Niederschläge wurden auf einer Nutsche abgesaugt, dreimal mit je 150 ml Wasser, 0,1%

Salzsäure und wieder Wasser gereinigt und anschließend aus verdünntem Aethanol umkristallisiert.

Schmelzpunkte und die Ergebnisse der Elementaranalyse ^{x)} waren identisch.

Schmelzpunkte: 188-190° (Literatur-Fp: 190-191°) (36)

Die Analyse für das Dianilinobenzochinon $C_{18}H_{14}O_2N_2$ ergab:

Berechnet: C: 74,46

H: 4,86

N: 9,64

Gefunden: (aus Phenol) C: 74,48

H: 5,02

N: 9,41

(aus Brenzkatechin) C: 74,51

H: 5,04

N: 9,35

b. Versuch einer Umsetzung des Kaffeesäurechinons mit

Phenylhydrazin

Die Umsetzung erfolgte nach einer von CLAYTON (36) gegebenen Vorschrift.

Die Reaktionsansätze enthielten:

50 mg p-Cumarsäure bzw. Kaffeesäure und

25 mg Phenylhydrazin, unter Erwärmen gelöst in je

35 ml M/75-Phosphatpuffer pH 7,0

Nach dem Abkühlen der Lösungen wurden jeweils 15 mg Enzym, gelöst in 5 ml bidestilliertem Wasser zugesetzt, und in die Gefäße unter ständigem Schütteln Luft eingeleitet. Nach drei Stunden wurden die dunkelbraunen Lösungen dreimal mit je 100 ml Aether extrahiert, die Extrakte je dreimal mit 100 ml Wasser, 5% Salzsäure und wieder Wasser gewaschen, über Natriumsulfat sicc. getrocknet und im Vakuum eingeengt. In beiden Ansätzen blieb ein braunes Öl zurück, aus dem nach Zugabe von Petrolaether unter Trübung Spuren einer braunen schmierigen Masse ausfielen. Kristallisationsversuche aus Aether/Petrolaether mißlangen.

^{x)} Die Analyse wurde im mikroanalytischen Laboratorium

A. Bernhardt, Mühlheim/Ruhr durchgeführt.

VII. Vergleichende dünnschichtchromatographische Untersuchungen der enzymatischen Oxydation des p-Kresols und 4-Methylbrenzkatechins

Die Reaktionsansätze enthielten:

43,2 mg p-Kresol bzw.

49,6 mg 4-Methylbrenzkatechin, gelöst in je

40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 5,2

In jeden Ansatz wurden 2 ml einer Enzymlösung mit 1 mg Enzym gegeben, nach 90 Minuten wurden nochmals je 2 ml einer Verdünnung mit 10 mg Enzym zugesetzt. Es wurde Luft eingeleitet. In bestimmten Zeitabständen -5 (nur beim Diphenol), 15, 30, 60, 90, 120 Minuten und 5, 10, 24 und 48 Stunden- wurden je 1,5 ml entnommen und diese mit 0,15 ml N-Salzsäure inhibiert. Nach dem Eluieren der Proben mit Essigester, dem Trocknen über Natriumsulfat sicc. und dem Einengen wurden sie auf einer Zelluloseplatte aufgetragen und mit 15% Essigsäure entwickelt.

VIII. Vergleichende dünnschichtchromatographische Untersuchungen der enzymatischen Oxydation von Brenzkatechin/Phenol, 3-Methylbrenzkatechin/Phenol und 4-Methylbrenzkatechin/Phenol, sowie Brenzkatechin/Anisol, 3-Methylbrenzkatechin/Anisol und 4-Methylbrenzkatechin/Anisol

Es wurden jeweils Lösungen der o-Dihydroxybenzolderivate mit einem Zusatz einer geringen Menge Phenol enzymatisch oxydiert.

In der 1. Versuchsreihe enthielten die Ansätze:

a) 44,0 mg Brenzkatechin und

3,76 mg Phenol, gelöst in

40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 5,2

b) 49,6 mg 3-Methylbrenzkatechin und

3,76 mg Phenol, gelöst in

40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 5,2

c) 49,6 mg 4-Methylbrenzkatechin und

3,76 mg Phenol, gelöst in

40 mg M/75-Phosphatpuffer pH 5,2

Jede Lösung wurde mit 1 mg Enzym gelöst in 2 ml bidestilliertem Wasser, versetzt. Nach 90 Minuten erfolgte ein erneuter Zusatz von je 10 mg Enzym, gelöst in 2 ml bidestilliertem Wasser.

In der 2. Versuchsreihe enthielten die obigen Ansätze statt der 3,76 mg Phenol jeweils 4,3 mg Anisol, gelöst in je 1,5 ml Aethanol.

Da das postulierte Ausbleiben des gelben Flecks R_f 0,73 in den 3 anisolhaltigen Lösungen auch auf eine eventuelle Reaktion zwischen den Chinonen und dem Aethanol zurückgeführt werden kann, wurden in einer weiteren Versuchsreihe phenolische Lösungen größerer und geringerer Konzentration unter Zusatz von je 1,5 ml Aethanol enzymatisch oxydiert.

In der 3. Versuchsreihe enthielten die Ansätze:

- a) 37,6 mg Phenol, gelöst in
 - 40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 5,2
 - 1,5 ml Aethanol
- b) 3,76 mg Phenol, gelöst in
 - 40 ml M/75-Phosphatpuffer pH 5,2
 - 1,5 ml Aethanol

Auch diese Lösungen wurden zunächst mit je 1 mg, nach 90 Minuten mit weiteren 10 mg Enzym, jeweils in 2 ml bidestilliertem Wasser gelöst, versetzt.

Das Einleiten der Luft, das Entnehmen und Weiterbehandeln der Proben bis zum Entwickeln der Chromatogramme erfolgte wie bei den vorangegangenen dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen beschrieben.

IX. Nichtenzymatische Reaktion zwischen Phenol und o-Benzochinon

a. Herstellung des o-Benzochinons

Die Synthese des o-Benzochinons erfolgte nach HORNER und DÜCKHEIMER (46)

2,2 g Brenzkatechin wurden in 10 ml absolutem Aether gelöst und zu einer Lösung von 5,02 g Tetrachlor-o-Chinon in 60 ml absolutem Aether gegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde unter dauerndem Rühren und Kühlen mit einer Mischung aus

Trockeneis/Methanol auf -50° abgekühlt. Nach 2 Stunden wurde das schwarze Chinon (etwa 1 g) vorsichtig abgesaugt, aus absolutem Aether umkristallisiert und sofort weiterverarbeitet.

b. Umsetzung des o-Benzochinons mit Phenol

Die Umsetzung zwischen dem nichtenzymatisch gebildeten o-Benzochinon und dem Phenol erfolgte nach den Vorschriften von MUSSO (43,44), in Analogie zu den Umsetzungen zwischen p-Chinon und Phenol.

Die Reaktion wurde im neutralen und sauren Milieu vorgenommen.

Neutraler Ansatz:

0,3 g o-Benzochinon und
1,8 g Phenol werden in eine Mischung von
85 ml Wasser und
15 ml Methanol gegeben.

Die neutrale Lösung wurde bei Raumtemperatur einige Zeit stehengelassen, dann mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, ausgeäthert und der eingeeengte Extrakt auf einer Zelluloseplatte aufgetragen.

Saurer Ansatz:

5,64 g Phenol werden in einer Mischung von
35 ml 20% Schwefelsäure und
7 ml Methanol gelöst, auf 40° erwärmt und mit einer Suspension von
0,65 g o-Benzochinon in
10 ml Wasser versetzt.

Die saure Lösung wurde nach 20 Minuten mit Aether extrahiert, der Extrakt eingeeengt und auf einer Zelluloseplatte aufgetragen.

Beide Platten wurden mit 15% Essigsäure entwickelt und die gebildeten Flecken durch Besprühen mit diazotierter Benzindilösung (41) sichtbar gemacht.

c. Synthese des 4-Phenoxybrenzkatechins

Die Synthese erfolgte nach einer von JANSSEN, VAN ALLAN und WILSON (47) gegebenen Vorschrift.

aa. Silberoxid

Das Silberoxid wurde nach den von BRAUER (63) gemachten Angaben hergestellt.

Zunächst wurde in eine konzentrierte Lösung von 190 g Silbernitrat eine verdünnte Lösung von 60 g Natriumhydroxid (rotulis) in Wasser eingetragen, und der ausfallende Niederschlag von Silberhydroxid dekantiert und mit kohlendioxid-freiem Wasser gewaschen, bis er nitratfrei war. Das Silberoxid wurde abgesaugt, bei 85-88° getrocknet und sofort weiterverarbeitet.

bb. Silbertrifluoracetat

In 177 g Trifluoressigsäure wurde eine Suspension von 187 g Silberoxid in 500 ml Wasser eingetragen. Das Wasser wurde der klaren Lösung auf einem Wasserbad im Vakuum entzogen. Da das Rohprodukt offensichtlich die Poren einer Soxhlet-Extraktionsmühle verstopfte, mißlang der Versuch einer Extraktion mit Äther in der Soxhlet-Apparatur, wie es die Autoren vorschlugen. So wurde das Salz mit immer derselben Menge von 500-600 ml Äther auf einem Trichter extrahiert, und der Äther anschließend abdestilliert. Die Ausbeute betrug etwa 210 g Silbertrifluoracetat.

cc. 4-Jodoveratrol

Eine Mischung von 110 g Silbertrifluoracetat und 69 g Veratrol wurde in einen trockenen 1 Liter-Stutzen gebracht. Unter dauerndem Rühren wurde aus einem Tropftrichter eine Lösung von 127 g Jod in 750 ml Tetrachlorkohlenstoff über 1/2 Stunde hin zugesetzt. Auch das im Tetrachlorkohlenstoff ungelöste Jod wurde anschließend noch zugegeben. Nach zweistündigem Rühren wurde filtriert und der verbleibende Niederschlag mit 100 ml Tetrachlorkohlenstoff gewaschen. Der größere Teil des Lösungsmittels wurde vorsichtig auf dem Wasserbad entfernt, der Rest im Vakuum destilliert. Die Fraktion, die bei 152-155°/15 mm übergang, wurde aufgefangen. Man erhielt eine rotbraune, ölige Flüssigkeit. Die Ausbeute betrug etwa 74 g 4-Jodoveratrol.

dd. Natriumphenolat

Das Natriumphenolat wurde nach folgender Vorschrift (64) hergestellt.

Aequimolare Mengen Phenol und Natriumhydroxid (rotulis) wurden getrennt in bidestilliertem Wasser gelöst und dann vereinigt. Der klaren Lösung wurde auf dem Wasserbad im Vakuum das Wasser entzogen. Das zurückbleibende feste Produkt wurde noch 4-5 Stunden im siedenden Wasserbad unter reduziertem Druck erhitzt.

ee. 4-Phenoxy-Brenzkatechindimethylaether

50 g 4-Jodoveratrol, 47 g Natriumphenolat und 0,7 g Kupferpulver wurden in einen 500 ml-Dreihalskolben mit Rührer, Thermometer und Rückflußkühler gebracht. Die zähe, schwarze Mischung wurde unter ständigem Rühren 5 Stunden lang auf 200° erhitzt und anschließend in 500 ml Wasser gegossen. Diese wäßrige Suspension wurde dreimal mit je 1 Liter Benzol extrahiert, das Benzol im Vakuum entfernt, und die Fraktion, die bei $150-152^{\circ}/1,5$ mm siedete, aufgefangen. Es ging eine goldgelbe Flüssigkeit über, die über Nacht erstarrte. Sie wurde aus Petrolaether umkristallisiert. Es entstanden weiße, glänzende Schuppen von 4-Phenoxy-Brenzkatechindimethylaether. Die Ausbeute betrug etwa 12 g.

Schmelzpunkt: 44° (Literatur-Fp: 43°) (47)

Die Analyse für den 4-Phenoxy-Brenzkatechindimethylaether $C_{14}H_{14}O_3$ ergab ^{x)}:

Berechnet: C: 73,00

H: 6,13

Gefunden: C: 73,59

H: 6,40

ff. 4-Phenoxybrenzkatechin

24 mg wasserfreies Aluminiumchlorid und 4 g Natriumchlorid wurden in einem 250 ml-Becherglas geschmolzen und auf 120° erhitzt. Dann fügte man über 1/2 Stunde hin 5 g 4-Phenoxy-Brenzkatechindimethylaether hinzu. Danach goss man die Mischung in Eis und Salzsäure und extrahierte die erhaltene

^{x)} Die Analyse wurde im mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mühlheim/Ruhr durchgeführt.

Lösung dreimal mit je 500 ml Benzol. Nach dem Entfernen des Benzols im Vakuum wurde die Fraktion, die bei $180-185^{\circ}/1\text{ mm}$ siedete, gesammelt. Man erhielt etwa 2 g einer olivgrünen dicken Flüssigkeit.

Die erhaltene Substanz stimmte mit dem von der Firma Eastman Kodak Co., Rochester USA, gelieferten Vergleichspräparat überein. Nach dem Entwickeln mit 15% Essigsäure und beim Besprühen mit diazotierter Benzidinlösung (41) zeigten sich die gleichen Rf-Werte und die gleichen Färbungen.

X. Beschreibung der verwendeten Substanzen

1) Pufferlösung

Als Pufferlösung diente M/75-Phosphatpuffer pH 7,0/6,8/6,0 und 5,2 nach MICHAELIS (57).

2) 4-Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure) $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$

3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeesäure) $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$

4-Hydroxyphenylpropionsäure $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$

3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$

Alle 4 Substanzen wurden von der Firma C.Roth, Karlsruhe, bezogen und waren als "purum" deklariert. Nach dem Chromatographieren unter den in dieser Arbeit angegebenen Bedingungen, bei der Betrachtung im UV-Licht und nach dem Besprühen mit diazotierter Benzidinlösung (41), erwiesen sie sich als einheitlich.

3) Phenol $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$

Brenzkatechin $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$

Es wurden Substanzen der Firma E.Merck, Darmstadt, "pro analysi" benutzt. Das Phenol wurde durch Destillation, das Brenzkatechin durch Sublimation gereinigt.

4) Ascorbinsäure $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$

Die Ascorbinsäure wurde von der Firma E.Merck, Darmstadt, als "pro analysi"-Substanz geliefert. Nach den von STAHL (65) angegebenen Methoden wurde die Reinheit der Verbindung dünnschichtchromatographisch festgestellt.

5) p-Kresol C_7H_8O

Es wurde p-Kresol der Firma Riedel de Häen "purum" verwendet und durch Destillation gereinigt.

6) 3-Methylbrenzkatechin $C_7H_8O_2$

4-Methylbrenzkatechin $C_7H_8O_2$

Die beiden o-Dihydroxybenzolderivate wurden von der Firma Light Company, Colnbrook, England, bezogen und durch Destillation gereinigt.

7) Veratrol $C_8H_{10}O_2$

Trifluoressigsäure CF_3COOH

Tetrachlor-o-Chinon $C_6O_2Cl_4$

Die 3 Substanzen lieferte die Firma Th.Schuchardt, München.

8) Diazotierte Benzidinlösung (41)

Zu 10 ml einer 10%igen frisch bereiteten Natriumnitritlösung werden 15 ml einer Benzidinlösung (6 Teile Benzidinhydrochlorid, 14 Teile konz. Salzsäure, bidestilliertes Wasser ad 1000 ml) gegeben. Die schwarzbraune, trübe Lösung wurde geschüttelt, bis sie gelbbraun gefärbt und klar war. Die so zubereitete Lösung war im Eisschrank etwa 1 Tag haltbar.

9) Ninhydrinlösung (61)

0,2-0,3 g Ninhydrin wurden in 95 ml wassergesättigtem n-Butanol gelöst. Anschließend wurden 5 ml Collidin zugesetzt. Das besprühte Chromatogramm wurde 1/2-1 Stunde im Trockenschrank bei 80° getrocknet.

10) Phosphormolybdänsäurereagenz (zum Nachweis der Ascorbinsäure) (66)

5 g Phosphormolybdänsäure wurden in 100 ml Aethanol gelöst. Die Lösung mußte frisch bereitet werden. Nach dem Besprühen wurde das Chromatogramm 5 Minuten lang bei etwa $80-90^\circ$ getrocknet.

E. Literaturverzeichnis

- (1) HOFFMANN-OSTENHOF, O., Enzymologie Springer Verlag,
Wien (1954) S. 554
- (2) ONSLOW, M.W. u. ROBINSON, M.E., Biochem.J. 19, 420
(1925)
- (3) RAPER, H.S., Biochem. J. 20, 725 (1926)
- (4) RAPER, H.S., Physiol.Rev. 8, 245 (1928)
- (5) KUBOWITZ, F., Biochem.Z. 292, 221 (1937)
- (6) KUBOWITZ, F., Biochem.Z.299, 32 (1938)
- (7) DALTON, H.R. u. NELSON, J.M., J.Amer.chem.Soc. 61,
2946 (1939)
- (8) MALETTE, M.F. u. DAWSON, C.R., Arch.Biochemistry 23,
29 (1949)
- (9) KEILIN, D. u. MANN, T., Proc.Roy.Soc.(London) Ser.B.
125, 187 (1938)
- (10) KERTESZ, D., Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 9,
170 (1952)
- (11) MASON, H.S., Nature (London) 177, 79 (1956 a)
- (12) BORDNER, C.A. u. NELSON, J.M., J.Amer.chem.Soc. 61,
1507 (1939)
- (13) NELSON, J.M. u. DAWSON, C.R., Advances in Enzymol.
4, 133 (1944)
- (14) ONSLOW, H.M. u. ROBINSON, M.E., Biochem.J. 22, 1327
(1928)
- (15) MASON, H.S., Advances in Enzymol. 19, 79 (1957)
- (16) KERTESZ, D. u. AZZOPARDI, O., Bull.Soc.Chim.biol. 42,
945 (1960)
- (17) KERTESZ, D. u. AZZOPARDI, O., Compt.Rend.Soc.biol.
154, 270 (1960)
- (18) KERTESZ, D. u. ZITO, R., In O.Hayaishi "Oxygenases"
Academic Press, New York
(1962) S. 307
- (19) PUGH, C.E.M. u. RAPER, H.S., Biochem.J. 21, 1370
(1927)
- (20) SZENT GYÖRGYI, A., Biochem.Z. 162, 399 (1925)
- (21) DAWSON, C.R. u. NELSON, J.M., J.Amer.chem.Soc. 60,
245 (1938)

- (22) MASON, H.S., J.biol.Chemistry 181, 803 (1949)
- (23) WAGREICH, H. u. NELSON, J.M., J.Amer.chem.Soc. 60,
1545 (1938)
- (24) DAWSON, C.R. u. TARPLEY, W.B., New York Acad.Sci 100,
937 (1963)
- (25) MASON, H.S., SCHWARTZ, L. u. PETERSON, D.C., J.Amer.
chem.Soc. 67, 1233 (1945)
- (26) FORSYTH, W.G.C. u. QUESNEL, V.C., Biochim.biophysica
Acta 25, 155 (1957)
- (27) FORSYTH, W.G.C., QUESNEL, V.C. u. ROBERTS, J.D., Bio-
chim.biophysica Acta 37, 322 (1960)
- (28) BOUCHILLOUX, S. u. KODJA, A., Compt.rend. 247, 2484
(1958)
- (29) BOUCHILLOUX, S. u. LISSITZKY, S., Bull.Soc.Chim.biol.
40, 833 (1958)
- (30) HERRMANN, K., Naturwissenschaften 42, 462 (1955)
- (31) MASON, H.S. u. PETERSON, E.W., Biochim.biophysica
Acta 111, 134 (1965)
- (32) OKU, H., Phytopathol.Z. 38, 342 (1960)
- (33) ZINCKE, Th., Ber.dtsch.chem.Ges. 12, 1641 (1879)
- (34) KEHRMANN, F. u. CORDONE, M., Ber.dtsch.chem.Ges. 46,
3009 (1913)
- (35) SUIDA, H. u. SUIDA, W., Liebigs Ann.Chem. 416, 113
(1918)
- (36) CLAYTON, H., Arch.Biochem.Biophysics 81, 404 (1959)
- (37) LUDWIG, B.J. u. NELSON, J.M., J.Amer.chem.Soc. 61,
2601 (1939)
- (38) INGRAHAM, L.L., J.Amer.chem.Soc. 76, 3777 (1954)
- (39) KHARKANIS, Y. u. FRIEDEN, E., J.biol.Chemistry 236,
PC 1 (1961)
- (40) FOX, A.S. u. BURNETT, J.B., Proc.Soc.exp.Biol.Med.
98, 110 (1958)
- (41) ROUX, D.G. u. MAIHS, A.E., J.Chromatogr. 4, 65 (1960)
- (42) MILLER, H. u. DAWSON, C.R., J.Amer.chem.Soc. 63, 3375
(1941)
- (43) MUSSO, H., Angew.Chem. 75, 965 (1963)
- (44) MUSSO, H., v.GIZYCKI, U., ZAHORSKY, U.I. u.
BORMANN, D., Liebigs Ann.Chem. 676, 10 (1964)

- (45) MASON, H.S., *Advances in Enzymol.* 16, 105 (1955)
- (46) HORNER, L. u. DÜRCKHEIMER, W., *Z.Naturforsch.* 14b,
741 (1959)
- (47) JANSSEN, D.E., VAN ALLAN, J. u. WILSON, C.V., *J.org.*
Chemistry 20, 1326 (1955)
- (48) BACH, A. u. CHODAT, R., *Ber.dtsch.chem.Ges.* 37, 1342
(1904)
- (49) HERRMANN, K., *Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges.*
287/59, 497 (1954)
- (50) FRÖMMING, K.H., *Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges.*
295/67, 497 (1962)
- (51) HERRMANN, K., *Pharmazie* 9, 212 (1954)
- (52) STAHL, E., *Dünnschichtchromatographie* Springer Verlag,
Berlin-Göttingen-Heidelberg
(1962) S. 396
- (53) MIKHAILOV, M.K., *C.R.(Doklady) Acad.Sci.URSS* 121,
511 (1958)
- (54) MIKHAILOV, M.K., *C.R.Acad.bulg.Sci.* 11, 205 (1958)
- (55) TANNER, H. u. RENTSCHLER, H., *Fruchtsaft-Ind.* 1, 231
(1956)
- (56) KASTNER, H., *Dissertation Freie Universität Berlin*
1959
- (57) MICHAELIS, L., in E.Bamann u. K.Myrbäck "Methoden der
Fermentforschung" Verlag Georg
Thieme, Leipzig (1941) S. 780
- (58) GRAUBARD, M. u. NELSON, J.M., *J.biol.Chemistry* 111,
757 (1935)
- (59) GRAUBARD, M. u. NELSON, J.M., *J.biol.Chemistry* 112,
135 (1935)
- (60) STAHL, E., *Dünnschichtchromatographie* Springer Verlag,
Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
S. 5
- (61) *Chromatographie, 2. Auflage, her-*
ausgegeben von E.Merck AG
Darmstadt, S. 135
- (62) EASTOE, J.E., *Biochem.J.* 61, 589 (1955)

- (63) BRAUER, G., Handbuch der präparativen Anorganischen Chemie, F. Enke Verlag, Stuttgart (1962) Bd. II S. 912
- (64) Organic syntheses 33, 43 (1953)
- (65) STAHL, E., Dünnschichtchromatographie Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962) S. 253
- (66) STAHL, E., Dünnschichtchromatographie Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962) S. 511

Lebenslauf

Am 15. Juli 1935 wurde ich, Gerhard Heinrich Mues, als Sohn des Facharztes für innere Krankheiten Dr. med. Heinrich Mues und seiner Ehefrau Leni, geb. Kaiser in Berlin geboren.

Von 1942 bis 1946 besuchte ich die Volksschule und trat anschließend in das Berlinische Humanistische Gymnasium zum Grauen Kloster ein. 1950 wechselte ich zum Humanistischen Gymnasium zu Berlin-Steglitz über, wo ich im März 1955 meine Reifeprüfung ablegte. Am 1. Oktober 1955 begann ich mit meiner Lehrzeit in der Herder Apotheke in Berlin.

Im September 1957 legte ich die pharmazeutische Vorprüfung ab und begann im November desselben Jahres das Pharmaziestudium an der Technischen Universität Berlin. Nach zwei Semestern setzte ich mein Studium am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin fort, wo ich im Oktober 1960 meine pharmazeutische Prüfung bestand.

Als Kandidat der Pharmazie war ich in der Wolfgang Apotheke tätig und erhielt im Oktober 1962 meine Approbation als Apotheker. 1962 begann ich am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Karl-Heinz Frömming mit der vorliegenden Arbeit.

